

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Física I**



**TESIS DOCTORAL**

**Nuevas estrategias de compactación y transfección de DN-RNA en  
terapia génica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Martínez Negro**

Directores

**Elena Junquera González**

**Emilio Aicart Sospedra**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Física I**



**TESIS DOCTORAL**

**NUEVAS ESTRATEGIAS DE  
COMPACTACIÓN Y TRANSFECCIÓN DE  
DNA/RNA EN TERAPIA GÉNICA**

Memoria para optar al grado de doctor  
presentada por

María Martínez Negro

Directores:

Elena Junquera González  
Emilio Aicart Sospedra

**Madrid 2017**







A mi abuelo Paco



*“Al comienzo lo aborrecía porque la empujaba a ser libre y por responderle, cuando le pedía consejo, que todos los objetivos eran similares, con la condición de vivirlos a fondo, que lo importante no es llegar, sino caminar y sobre todo tropezar, pues eso nos obliga a cuestionarnos. También decía que los ideales eran ataúdes que nos inmovilizan, nos impiden ver y oír, y solo los débiles actúan por ideales que han tomado prestados, pues no tienen valor para ponerse en pie por sí solos. También hablaba de que la felicidad no es el resultado de tal o cual acontecimiento, sino de la capacidad de vivir el instante tal como es, pues somos nosotros los que les damos a las cosas su color triste o alegre.”*

Mourad, K. *De parte de la princesa muerta*



# AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis se ha llevado a cabo en la Universidad Complutense de Madrid, en el Departamento de Química Física I, a quienes agradezco los servicios prestados, así como la concesión del proyecto UCMO5-33-010. Asimismo agradezco al Ministerio de Economía Industria y Competitividad por la financiación recibida a través de los proyectos, ACI2009-0867, CTQ2012-30821 y CTQ2015-65972-R (MINECO/FEDER, UE). Agradecer a la línea NCDII-ALBA de Barcelona y a la Universidad Autónoma de Barcelona, en cuyas instalaciones se han llevado a cabo las medidas de SAXS y Crio-TEM.

Agradecer al grupo del Prof. Santanu Bhattacharya del Departamento de Química Orgánica del Indian Institute of Science (IISc) de Bangalore por la síntesis de los compuestos gemini, así como por su colaboración en los estudios de silenciamiento. Al Prof. Luis García Río del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela, a los Profs. C. Ortiz Mellet y J.M. García Fernández del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla (IIQ), a la Dra. Lourdes Pérez del Grupo de Tensioactivos Biocompatibles del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (CSIC) de Barcelona y a la Prof. María Luisa Moyá del laboratorio de Química Coloidal y Catálisis Micelar de la Universidad de Sevilla por la síntesis de diferentes compuestos que me han permitido la elaboración de este trabajo. Especialmente a la Dra. Clara Aicart por la síntesis del plásmido.

Me gustaría agradecer de manera especial a las personas que se han cruzado en mi camino estos años y han contribuido de una manera u otra al desarrollo de esta Tesis.

En primer lugar agradecer a mis directores, Elena Junquera y Emilio Aicart, por haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro grupo. Gracias por enseñarme con tanta dedicación, empeño y paciencia todo lo que implica este trabajo, haciendo las cosas siempre con rigor y criterio científico. Todavía recuerdo aquel correo con el asunto “tengo que verte urgentemente” con el que empezó esta bonita etapa; con miedo a hacerlo bien y estar a la altura, pero también con ilusión y ganas de aprender. De eso ya hace casi cuatro años y solo puedo agradeceros el apoyo y confianza que me habeis ofrecido en todo momento, haciendome ver que yo era capaz de sacar esto adelante. Simplemente, gracias.

A los miembros del grupo; Ana, gracias por enseñarme todo lo que sabías, porque sin tu ayuda inicial esto habría sido mucho más difícil. Gracias por animarme y aconsejarme en esta última etapa. Natalia, compartir estos últimos meses contigo ha sido un placer, gracias por estar pendiente de ayudarme en cualquier cosa.

Hacer extensible estos agradecimientos a la Prof. Conchita Tros de Ilarduya del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra, por dejarme disponer durante tres meses de su laboratorio, así como por todo los conocimientos adquiridos. Gracias Hugo y Mikel, por el buen acogimiento que me disteis, por enseñarme a trabajar con las células siempre de buen humor. Especialmente gracias a María, por preocuparte que siempre estuviera a gusto y discutir conmigo aspectos científicos. Y por supuesto, gracias a Laura, por tu infinita paciencia, por sacar siempre un hueco para ayudarme y sobretodo, convertirte en una gran amiga.

Asimismo al Prof. Giulio Caracciolo del Departamento de Medicina Molecular de la Università di Roma “Sapienza”, donde realicé una estancia de tres meses. Agradecer a Sara y Valentina por el gran acogimiento, por resolver todas mis dudas y enseñarme paso a paso.

Expresar mi agradecimiento a la Prof. Ester García del Departamento de Química Inorgánica I, porque los dos años que estuve bajo tu dirección, durante la carrera y el master, me permitieron adquirir conocimientos que me han sido de gran ayuda. Gracias por interesarte por el desarrollo de esta tesis.

Puesto que la mayor parte del tiempo lo he pasado en el departamento de Química Física I, ha sido de gran importancia el apoyo recibido de los compañeros que han pasado por él. Gracias por hacer de las comidas y meriendas el mejor momento del día. Por nuestras celebraciones “fin de mes”, las cañas, las tardes de cine y tantos momentos que hemos pasado juntos. Marta, por ser tan espontánea y preocuparte tanto por mí. David, gracias por encargarte de los desayunos, meriendas y cenas, porque sin ti, era un descontrol.

Laura, Ana y Mari Jose, ¿Qué deciros? Habeis hecho de este último año el mejor de esta tesis. Laura, porque no me equivocaba cuando te veía por los pasillos y pensaba “esa chica parece muy maja, creo que nos llevaríamos bien”. Gracias por tus “Buenos días” sin faltar ni una mañana, por pedirme consejo, por la ilusión que me hacía recibir huevos kinder y posit en la mesa, por tu ayuda con los formatos de la tesis, y, por supuesto, por fundar mi club de fans. Ana, por estar ahí desde mi primer año en el departamento, por preocuparte y estar siempre pendiente que no comiera nada que no debía, por esos magníficos brownies, por tantas risas, (prometo llevarte en coche más veces). Mari Jose, una pena no haberte conocido antes. Gracias por tus consejos científicos y personales, que han sido muchos, por tu risa contagiosa, nuestros paseos todas las tardes hasta Moncloa y preocuparte siempre que todos estemos bien. Gracias por vuestras visitas al despacho, escuchar mis agobios, y por vuestras palabras de ánimo, por preocuparos tanto por mí. Habeis hecho que esta tesis sea una experiencia realmente bonita de la que me llevo grandes amigos.

Mi más sincero agradecimiento a Álvaro, no solo por las aportaciones científicas, sino por estar siempre pendiente, dispuesto a escuchar cualquier problema y a ayudar sin importar el momento ni la distancia. Por tu apoyo incondicional.

Al resto de amigos que de una manera u otra, han compartido conmigo esta etapa. A Carol y Clara, por estar ahí desde la carrera, porque al final, siempre quedan los mejores. A Aída por tu ayuda científica, por resolver todas mis dudas sobre plásmidos y células. Gracias por los buenos momentos.

A Elena, gracias por tus visitas al despacho, por nuestras interminables conversaciones y por tu ayuda siempre que lo he necesitado. Maider, gracias por tu apoyo incondicional, dispuesta a ayudarme y aconsejarme sobre cualquier cosa.

Y, por supuesto, a mis inseparables Ana, Nuria y Teresa, porque no hay palabras que expresen lo afortunada que me siento por teneros como amigas. Gracias por las noches de baile, nuestro viajes (más o menos accidentados), las conversaciones hablando de todo y de nada. Hemos pasado muchas cosas importantes, llorado y reído juntas, pero compartir esta etapa con vosotras, cada una con su tesis, con sus agobios y satisfacciones, lo ha hecho realmente especial. Porque cuando estamos juntas, da igual el tiempo y el lugar. Gracias por no fallarme nunca.

A mi familia, especialmente a mis hermanos, por vuestra alegría, porque estamos siempre unidos, porque no puedo quereros más. A mis padres por vuestro esfuerzo y sacrificio para que nunca nos faltara de nada, por enseñarnos que no hay nada imposible con fuerza de voluntad.

A Guille, por ser el mayor apoyo que tengo, por no dejarme caer nunca. Porque juntos formamos el mejor de los equipos.

# INDICE

---

<b>Glosario de Acrónimos</b>	1
<b>Glosario de Símbolos</b>	7
<b>Summary</b>	11
<b>Resumen</b>	13
<b>1. Objetivos</b>	15
<b>2. Antecedentes y Estado Actual</b>	17
2.1. Introducción	17
2.2. Agentes terapéuticos usados en terapia génica: ácidos nucleicos	23
2.3. Métodos de vehiculización del material genético: vectores génicos	27
2.3.1. Vectores lipídicos	30
2.3.2. Vectores macrocíclicos con matriz lipídica	37
2.4. Interacción del complejo vector-ácido nucleico con los fluidos biológicos	43
2.5 Bibliografía	49
<b>3. Aspectos Metodológicos</b>	51
<b>4. Experimental</b>	57
4.1 Materiales	57
4.1.1. Lípidos Catiónicos (CLs y GCLs)	57
4.1.2 Lípidos Zwitteriónico y Neutro	58
4.1.3. Vectores Macrocíclicos	59
4.1.4. Ácidos Nucleicos	59
4.2. Preparación de Vectores Génicos	60
4.2.1. Preparación de Películas Lipídicas	60
4.2.2. Preparación de Liposomas con Sondas Fluorescentes	61
4.2.3. Preparación de Muestras Ciclodextrinas Anfífilicas Policationicas (paCDs)	61
4.2.4. Preparación de Lipoplejos y CDplejos	61
4.3 Métodos Experimentales	62

4.3.1. Potencial Zeta	62
4.3.2. Electroforesis en Gel de Agarosa	63
4.3.3. Anisotropía de Fluorescencia	64
4.3.4. Criomicroscopia Electrónica de Trasmisión	65
4.3.5. Dispersión de Rayos X a bajo ángulo	66
4.3.6. Nanocromatografía de Líquidos Acoplada a Detector de Masas-Masas (nanoLC-MS/MS)	68
4.3.7. Estudios de Transfección	69
4.3.8. Estudios de Silenciamiento	71
4.3.9. Ensayos de Viabilidad Celular	72
4.3.10. Microscopia Confocal de Fluorescencia (CFM)	74
4.4. Bibliografía	75
<b>5. Resultados y Discusión</b>	77
5.1. Transfección de pDNA mediante vectores génicos no virales	78
5.1.1. Vectores Lipídicos	78
5.1.2. Vectores Macrocíclicos: Ciclodextrinas Anfifílicas Policatiónicas (paCDS).	109
5.2. Vectores transportadores de siRNA: silenciamiento génico	129
5.2.1. Vectores Lipídicos catiónicos gemini (C <sub>16</sub> Im) <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /MOG	129
5.3 Bibliografía	153
<b>6. Aspectos Más Relevantes</b>	147
<b>7. Conclusions</b>	155
<b>Anexo 1</b>	161
<b>Anexo 2</b>	173



## SUMMARY

## **NEW STRATEGIES ON DNA/RNA COMPACTION AND TRANSFECTION IN GENE THERAPY**

### **SUMMARY**

Gene therapy aims to treat hereditary or acquired diseases at the molecular level, either by repairing possible damages of cellular DNA, by inserting DNA plasmids (pDNA) into the cytoplasm of damaged cells, or by blocking (silencing) the pathogenic function of some gene by insertion of small interfering RNAs (small interfering RNA or siRNA). Among the different methods for transfecting nucleic acids into the cellular interior, colloidal and / or supramolecular self-aggregating systems have recently been revealed as a plausible alternative to viral vectors, commonly used in the past. In particular, cationic (CLs) or anionic (ALs) lipids, inorganic magnetic or non-magnetic NPs, supramolecular cycles (calixarenes CXs or pillararenes PLs) or polyamphiphilic cyclodextrins (paCDs) are capable of compacting DNA by an entropically driven surface electrostatic interaction, and transfected into the damaged cells. However, in spite of all that is known of this process, there are still certain problems to be solved, such as the low levels of cellular transfection and the relatively high cytotoxicity of these vectors in cellular environments. In addition, little is known about the process of nucleic acid release once the vector has passed through the plasma membrane, whereby there is little or no control over the potential of a given carrier system as an *in vitro* transfection agent and, finally, *in vivo*. It is for this reason that a special attention is now being devoted to this field of research in trying to understand how the therapeutic agent is released inside the cell and what are the physiological barriers that can be found on its way to the nucleus. Undoubtedly, achieving the goal of being able to cure diseases with new gene therapy protocols requires deep knowledge and control of both stages of the transfection process: the first, focused on good compaction and transport of the nucleic acid through the membrane, and the second, aimed at the release of the genetic material in the appropriate cellular environment.

This PhD Thesis involves a multidisciplinary approach that seeks to minimize the negative aspects of these non-viral systems and, as far as possible, to look for new alternatives. There are three main objectives:

- I) Search for new non-viral gene vectors, capable of transfecting pDNAs into different cell types, with better performance than current non-viral vectors and viral vectors. This objective, which constitutes the center line of the research group to which I belong, focuses on the design, synthesis, and characterization of different types of molecules with very varied structures.
- II) Search for new therapeutic agents. New line of research in the group, based on the compaction and internalization of siRNAs, with the aim of not replacing defective sequences of DNA, but of blocking certain genes responsible for some disease. It is what is known as gene silencing and is attracting a lot of attention lately within this field of investigation.
- III) Study of the cellular internalization process and release of the therapeutic agent. This objective is focused, not so much on knowing and controlling the nucleic acid compaction, but on understanding how the vector crosses the

plasma membrane and what physiological barriers are found; in particular, what happens when the vector comes into contact with biological fluids, an aspect of crucial importance for in vivo studies, and finally in clinical trials.

Any of the above approaches is based on a threefold plan that includes: i) vector synthesis; ii) biophysical characterization of the complexes that these vectors form with the nucleic acid; and iii) biochemical evaluation of the previously characterized complexes.

In the biophysical characterization, high precision experimental techniques have been used, such as electrophoretic-zeta potential mobility, agarose gel electrophoresis, fluorescence anisotropy, small angle X-ray scattering (SAXS), dynamic light scattering (DLS ) and electron transmission microscopy (cryo-TEM). Once the complexes have been characterized, their potential for effectively and safely transfecting cells has been evaluated; that is, its ability to cross the cell membrane and release the biopolymer in the cytoplasm, as well as its toxicity in cellular environments (cytotoxicity) have been quantified, both properties of crucial relevance in the potential use of the systems studied in gene therapy protocols. To this end, common techniques in this field have been used, such as flow cytometry (FACS), luminometry, DNase protection assays, and cell viability assays. Finally, in order to understand the mechanisms of cellular internalization as well as the influence of the interaction of the carrier system with the biological fluids in the nucleic acid transfection process, confocal fluorescence microscopy (CFM) and a key technique in proteomic investigation, NanoLC-MS-MS, have been used.

It is expected that the multidisciplinary approach proposed in this PhD Thesis will help to have a more detailed and in-depth knowledge of the mechanisms of cellular transfection of nucleic acids and, consequently, to improve the performance of the current gene vectors in vitro, and, if it is possible, in vivo. This is undoubtedly a fundamental step in developing new and improved gene therapy protocols in the treatment of different inherited and acquired diseases, such as cancer, hemophilia, cystic fibrosis, neuromuscular disorder, etc. The achievement of this PhD Thesis can contribute to this important goal.

The report presented is structured as follows. Once the Objectives (Chapter 1) are introduced, a chapter is dedicated to briefly describing the Background and State of the Art of the field of research in which this PhD Thesis is framed (Chapter 2), followed by two sections, Experimental (Chapter 3) and Methodological Aspects (Chapter 4), devoted to the experimental questions of the developed studies. The most outstanding Results of this thesis and its Discussion are presented in Chapter 5, to conclude with two chapters where the Most Relevant Aspects (Chapter 6) and the Conclusions (Chapter 7) of this PhD Thesis are resumed.

RESUMEN

# NUEVAS ESTRATEGIAS DE COMPACTACION Y TRANSFECCIÓN DE DNA/RNA EN TERAPIA GÉNICA

## RESUMEN

La Terapia Génica pretende tratar enfermedades hereditarias o adquiridas, a nivel molecular, bien reparando posibles daños del DNA celular, mediante la inserción de plásmidos de DNA (pDNA) en el citoplasma de las células dañadas, o bloqueando (silenciando) la función patogénica de algún gen mediante la inserción de RNAs pequeños de interferencia (small interfering RNA o siRNA). Entre los distintos métodos para transfectar ácidos nucleicos al interior celular, los sistemas autoagregados coloidales y/o supramoleculares se han revelado en los últimos tiempos como una alternativa plausible a los vectores víricos, habitualmente utilizados en el pasado. En particular, los lípidos catiónicos (CLs) o aniónicos (ALs), las NPs inorgánicas magnéticas o no magnéticas, ciclos supramoleculares (calixarenos CXs o pilararenos PLs) o las ciclodextrinas polianfílicas (paCDs) son capaces de compactar DNA mediante una interacción electrostática superficial entrópicamente dirigida, y transfectarlo al interior de las células dañadas. Sin embargo, a pesar de todo lo que ya se conoce de este proceso, quedan todavía ciertos problemas por resolver, como los bajos niveles de transfección celular y la relativamente alta citotoxicidad de estos vectores en entornos celulares. Además, se sabe poco acerca del proceso de liberación del ácido nucleico una vez el vector ha traspasado la membrana plasmática, por lo que se tiene escaso o nulo control sobre el potencial de un determinado sistema vehiculizador como agente de transfección *in vitro* y, finalmente, *in vivo*. Es por ello que se está dedicando actualmente una especial atención dentro de este campo de investigación a intentar entender cómo se libera el agente terapéutico en el interior de la célula y cuáles son las barreras fisiológicas que puede encontrarse en su camino hacia el núcleo. Sin duda, conseguir el objetivo de poder curar enfermedades con nuevos protocolos de terapia génica pasa por tener un profundo conocimiento y control sobre ambas etapas del proceso de transfección: la primera, centrada en una buena compactación y transporte del ácido nucleico a través de la membrana, y la segunda, dirigida a la liberación del material genético en el entorno celular adecuado.

Esta Tesis Doctoral implica un planteamiento multidisciplinar que pretende minimizar los aspectos negativos de estos sistemas no virales y, en la medida de lo posible, buscar nuevas alternativas. Se plantean para ello tres grandes objetivos:

- i) Búsqueda de nuevos vectores génicos no virales, capaces de transfectar pDNAs al interior de distintos tipos de células, con mejores prestaciones que los actuales vectores de tipo no viral y que los vectores virales. Este objetivo, que constituye la línea central del grupo de investigación al que pertenezco, se focaliza en el diseño, síntesis, y caracterización de distintos tipos de moléculas con estructuras muy variadas.
- ii) Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. Nueva línea de investigación en el grupo, basada en la compactación e internalización de siRNAs, con el objetivo no de reemplazar secuencias defectuosas de DNA, sino de bloquear ciertos genes responsables de alguna enfermedad. Es lo que se conoce con silenciamiento

génico (gene silencing) y está despertando una gran atención últimamente dentro de este campo de investigación.

iii) Estudio del proceso de internalización celular y liberación del agente terapéutico. Objetivo que se centra, no tanto en conocer y controlar la compactación del ácido nucleico, sino en entender cómo atraviesa la membrana plasmática y qué barreras fisiológicas se encuentra; en particular, qué sucede cuando el vector entra en contacto con los fluidos biológicos, aspecto de crucial importancia para los estudios *in vivo*, y, finalmente, en los ensayos clínicos.

Cualquiera de los planteamientos anteriores se asienta en un triple enfoque que abarca: i) síntesis de vectores; ii) caracterización biofísica de los complejos que estos vectores forman con el ácido nucleico; y iii) evaluación bioquímica de los complejos previamente caracterizados.

En la caracterización biofísica, se han utilizado técnicas experimentales de alta precisión, tales como movilidad electroforética-potencial zeta, electroforesis en gel de agarosa, anisotropía de fluorescencia, dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS), dispersión de luz dinámica (DLS) y microscopía de transmisión electrónica (crio-TEM). Una vez caracterizados los complejos, se ha evaluado su potencial para transfectar células de forma eficaz y segura; es decir, se ha cuantificado su capacidad para atravesar la membrana celular y liberar el biopolímero en el citoplasma, así como su toxicidad en entornos celulares (citotoxicidad), ambas propiedades de crucial relevancia en la potencial utilización de los sistemas estudiados en protocolos de terapia génica. Para este fin, se ha recurrido a técnicas habituales en este campo, como citometría de flujo (FACS), luminometría, ensayos de protección frente a DNAsas, y ensayos de viabilidad celular. Por último, para lograr entender los mecanismos de internalización celular así como la influencia de la interacción del sistema vehiculizador con los fluidos biológicos en el proceso de transfección del ácido nucleico, se han utilizado la microscopía confocal de fluorescencia (CFM) y una técnica clave en investigación proteómica, NanoLC-MS-MS.

Es de esperar que la aproximación multidisciplinar planteada en esta Tesis Doctoral ayude a tener un conocimiento más detallado y profundo de los mecanismos de transfección celular de ácidos nucleicos y, en consecuencia, a mejorar las prestaciones de los actuales vectores génicos *in vitro*, y, si es posible, *in vivo*. Éste es, sin duda, un paso fundamental para poder desarrollar nuevos y mejorados protocolos de terapia génica en el tratamiento de diferentes enfermedades tanto hereditarias como adquiridas, tales como el cáncer, la hemofilia, la fibrosis quística, el desorden neuromuscular, etc. La consecución de esta Tesis Doctoral puede contribuir a este importante fin.

La Memoria que se presenta está estructurada de la siguiente forma. Una vez indicados los Objetivos (Capítulo 1), se dedica un capítulo a describir brevemente los Antecedentes y Estado Actual del campo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral (Capítulo 2), seguido de dos secciones, Experimental (Capítulo 3) y Aspectos Metodológicos (Capítulo 4), dedicadas a las cuestiones experimentales de los estudios desarrollados. Los Resultados más destacables de esta Tesis y su Discusión se presentan en el Capítulo 5, para finalizar con dos capítulos donde se resumen los Aspectos Más Relevantes (Capítulo 6) y las Conclusiones (Capítulo 7) de esta Tesis Doctoral.

## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

# ***GLOSARIO DE ACRÓNIMOS***

---

12PH	N-bencil-N,N-dimetil-N-(1-dodecil) amonio
12PH12	N-N'-(1,3-fenilen bis (metilen)) bis (N,N-dimetil-N-(1-dodecil) amonio

## **A**

AAV	Virus adenoasociado
ACN	Acetonitrilo
ADA	Gen adenosina desaminasa
ADM70	Tetradecahidrocloruro de per-{6-S-(2-(N',N'-bis-(2-aminoetil)tioreido)etiltio)-2,3-di-O-Hexanoil} ciclomaltoheptaosa
ADM105	Tetradecahidrocloruro de per-{6-S-(2-(N'-(N"-2-(2-aminoetil)aminoetil)tioreido)etiltio)-2,3-di-O-hexanoil} cyclomaltoheptaosa
ALs	Lípidos aniónicos
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosin trifosfato

## **B**

bp	Par de bases de DNA
----	---------------------

## **C**

C <sub>16</sub> His	1,5 bis (dimetilhistidina hexadecanoil amida) 1,5 pentanodiamida
(C <sub>16</sub> Im) <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Bromuro de 1,2-bis(hexadecilimidazol)oxietileno
C <sub>6</sub> (LL) <sub>2</sub>	Cloruro de N <sup>α</sup> ,N <sup>ω</sup> -bis(Na-lauroil-lisina)α,ω-hexilendiamida



C <sub>6</sub> C <sub>22</sub> C <sub>6</sub>	1, 22-bis (hexil dimetil amino) docosano
CCD	Cámara de detección de luz (charge-coupled device)
CDs	Ciclodextrinas
CFM	Microscopía confocal de fluorescencia
CMC	Concentración micelar crítica
CLs	Lípidos catiónicos
Crio-TEM	Crio-microscopia electrónica de transmisión
COS-7	Línea celular derivada del tejido pulmonar del mono.
ctDNA	DNA lineal de doble hebra procedente del timo de ternera ( <i>Calf thymus</i> )
CT	Estructura tipo <i>cluster</i>
CTs	Ciclotrehalanas
CVC	Concentración vesicular crítica
CXs	Calixarenos
<b>D</b>	
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAasas	Enzimas que degradan el DNA
DC-Chol	Cloruro de 3-β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]-colesterol
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio de cultivo modificado de Dubelco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOGS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-succinato
DOPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
DOPE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOPG	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) de sodio

---

DOPS	1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina de sodio
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio
DPBS	Disolución reguladora salina de fosfatos
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	DL-Ditiotreitol
<b>E</b>	
EI	Ionización de electrones
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
ESI	Ionización por electrospray
<b>F</b>	
FACS	Citometría de flujo con <i>Cell Sorting</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
FP	Estructura tipo <i>fingerprint</i>
FTIR	Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier
<b>G</b>	
GCLs	Lípidos catiónicos gemini
GFP	Proteína verde fluorescente
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
<b>H</b>	
H <sub>II</sub> <sup>c</sup>	Fase hexagonal inversa de cristal líquido liotrópico
H1299	Línea celular humana de carcinoma de pulmón
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEK293T	Línea celular humana de cáncer de riñon 293 T.

HeLa	Línea celular humana de cáncer cérvico-uterino
HEPES	Disolución reguladora HEPES-H + HEPES-Na
HP	Suero humano ( <i>human plasma</i> )

## **I**

IC <sub>50</sub>	Inhibición de crecimiento al 50% de la población
------------------	--

## **L**

L <sub>α</sub>	Fase lamelar cristal líquido liotrópico
LB 1X	Disolución reguladora de carga 1X ( <i>loading buffer</i> )
LB 10X	Disolución reguladora de carga 10X ( <i>loading buffer</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lineal DNA	DNA lineal de doble hebra
Lipo2000	Lipofectamina 2000
Lipo2000*	Lipofectamina 2000 en presencia de suero FBS
LMV	Vesículas multilamelares
LUV	Vesículas unilamelares grandes

## **M**

MALDI	Ionización por láser
MCF-7	Línea celular humana de cáncer de pecho
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MLV	Vesículas multilamelares
MOG	Monoolein glicerol
mRNA	RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
MW	Peso molecular

MWNSC	Porcentaje del peso molecular normalizado para una proteína
-------	---

## **N**

NanoLC	Nano-cromatografía de líquidos
--------	--------------------------------

NPs	Nanopartículas
-----	----------------

NSCs	Normalización de conteo espectral
------	-----------------------------------

## **O**

Opti-MEM	Medio de cultivo modificado
----------	-----------------------------

## **P**

paCDs	Ciclodextrinas anfífilas policatiónicas
-------	---

PBO234	Heptahidrocloreto de per-(6-S-(2-aminoetil)-2,3-di-O-hexanoyl} cyclomaltoheptaosa
--------	---

pDNA	Plásmido de DNA
------	-----------------

pEGFP-C3	Plásmido que codifica para la expresión de la proteína GFP
----------	--

pCMV-Luc	Plásmido que codifica para la expresión de la proteína luciferasa
----------	---

PI	Ioduro de propidio
----	--------------------

PLs	Pilararenos
-----	-------------

PPi	Pirofosfato
-----	-------------

## **R**

RISC	Complejo multiproteico inductor de silenciamiento génico
------	--

RNA	Ácido ribonucleico
-----	--------------------

RPA	Abundancia relativa de proteínas
-----	----------------------------------

RT	Estructura tipo <i>ribbon</i>
----	-------------------------------

## **S**

SAR	Relación estructura-actividad
-----	-------------------------------

SAXS                      Dispersión de rayos-X a bajo ángulo

SDS                        Dodecil sulfato de sodio

siRNA                     RNA pequeño de interferencia

SUV                        Vesículas unilamelares pequeñas

**T**

TAE                        Disolución reguladora compuesta de Tris-HCl, acetato y EDTA (pH = 8,2)

TBE                        Disolución reguladora compuesta de Tris- HBO<sub>3</sub>-EDTA

TCR                        Sub-unidades de receptor de células T

TFA                        Ácido trifluoroacético

**V**

V<sub>I</sub>                          Fase cúbica bicontinua de cristal líquido liotrópico

## GLOSARIO DE SÍMBOLOS

# GLOSARIO DE SÍMBOLOS

---

$a_0$	Área efectiva de la cabeza polar en la superficie del agregado
$d$	Espaciado de la red $d_{hkl}$
$d_{DNA}$	Distancia entre dos plásmidos consecutivos en la monocapa acuosa
$d_m$	Espesor de la bicapa lipídica
$d_w$	Espesor de la monocapa acuosa donde se compacta el DNA
$e$	Carga del electrón ( $= 1.602 \times 10^{-19}$ C)
$f$	Coefficiente de fricción
$f(\kappa_D a)$	Función de Henry
$G$	Factor G de corrección del fluorímetro
$H$	Intensidad del campo magnético
$I$	Intensidad de los máximos de difracción en los difractogramas de SAXS
$I_{HH}$	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y en la emisión
$I_{HV}$	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada horizontalmente en la excitación y verticalmente en la emisión
$I_{VH}$	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y horizontalmente en la emisión
$I_{VH}$	Intensidad de luz (de fluorescencia) polarizada verticalmente en la excitación y en la emisión
$k_B$	Constante de Boltzmann ( $= 1.381 \times 10^{-23}$ J/K)
$l_c$	Longitud crítica (longitud máxima efectiva) de la cadena hidrófoba
$\overline{M}_{bp}$	Peso molecular promedio de un par de bases del DNA

$M_{L^+}$	Peso molecular del lípido catiónico
$M_{L^0}$	Peso molecular del lípido zwitteriónico
$m_{L^0}$	Masa del lípido zwitteriónico
$m_{L^+}$	Masa del lípido catiónico
$m_L$	Masa del lípido total
$m_{DNA}$	Masa total de DNA
$m_{CD}$	Masa total de la ciclodextrina
$m/z$	Relación masa-carga
$n$	Número de grupos (C <sub>2</sub> O) en la cadena espaciadora de los GCLs
$n^+$	Número de moles de cargas positivas
$n^-$	Número de moles de carga negativa
$n_c$	Número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada de un lípido
$n_{L^+}$	Moles de lípido catiónico
$n_{L^0}$	Moles de lípido zwitteriónico
$P_c$	Parámetro de empaquetamiento de Israelachvili
$q$	Vector de ondas
$q_{L^+}^+$	Cargas efectivas positivas del lípido catiónico
$q_{ctDNA}^-$	Cargas efectivas negativas del par de bases del DNA lineal
$q_{pDNA}^-$	Cargas efectivas negativas del par de bases del plásmido DNA
$r$	Anisotropía de fluorescencia
$T$	Temperatura
$T_m$	Temperatura de transición de fase termotrópica gel-fluido
$t$	Tiempo



$v$	Volumen de las cadenas hidrocarbonadas asumiendo que son fluidas e incompresibles
$\alpha$	Fracción molar de lípido catiónico en el liposoma mixto
$\gamma$	Semi-ángulo de recopilación de la lente magnificadora del microscopio
$\epsilon_0$	Permitividad del vacío ( $= 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ m}^{-1}$ )
$\epsilon_r$	Permitividad relativa
$\eta$	Viscosidad del disolvente
$\theta$	Semiángulo de dispersión
$\kappa_D^{-1}$	Longitud de Debye
$\lambda$	Longitud de onda de la radiación
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{ex}$	Longitud de onda de excitación
$\mu_e$	Movilidad electroforética
$\rho$	Relación molar de carga CL/DNA
$\rho_{eff}$	Relación molar de cargas efectiva CL/DNA
$\zeta$	Potencial zeta
$z_i$	Valencia de los iones presentes en la disolución



# CAPÍTULO 1

OBJETIVOS

# 1.- OBJETIVOS

---

Esta Tesis Doctoral tiene como finalidad esencial contribuir en el avance y optimización de nuevos protocolos en terapia génica no viral, que solventen los problemas planteados ya existentes y/o los mejoren. Cuando uno analiza con perspectiva el *state of the art* de este campo de investigación (al que se le dedica el siguiente capítulo de esta Memoria), detecta rápidamente los puntos potencialmente débiles de las estrategias existentes, y, en consecuencia, tiene una estimación inicial clara de en qué aspectos es urgente incidir.

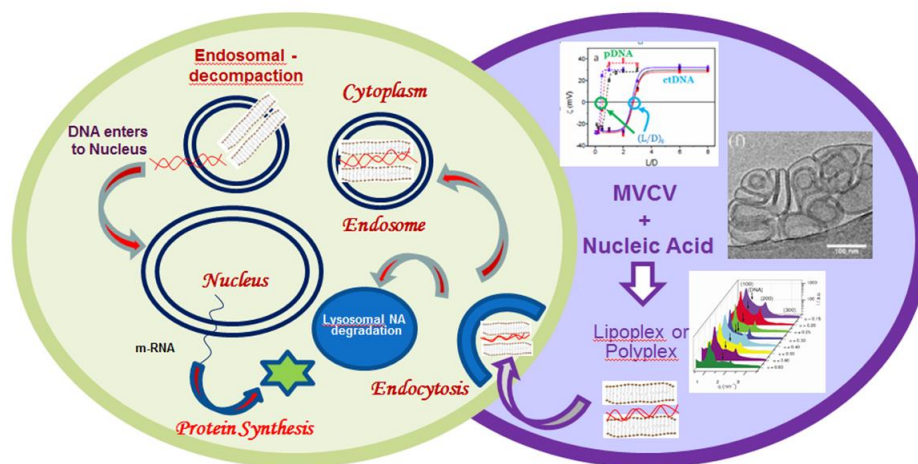
El proceso de transfección implica varias etapas: compactación del ácido nucleico - transporte a través de la membrana celular - liberación segura del ácido nucleico en el citosol - transporte a través de la membrana nuclear-expresión de la proteína correspondiente. En la actualidad, existen cientos de publicaciones con vectores no virales que presentan prestaciones moderadas, entendiendo por prestaciones el binomio alta tasa de transfección-baja citotoxicidad (o alta viabilidad celular). Y, por supuesto, existen otros tantos trabajos interesantes, bien planteados, pero basados en vectores con peores resultados. Normalmente, todos estos resultados se comparan con estándares universales, que, como tal, son aceptados por la comunidad científica, pero no exentos de limitaciones, y, por supuesto, sustituibles por otros que demuestren tener mejores prestaciones. Cuando el vector diseñado, sintetizado y caracterizado finalmente no transfecta, es decir, cuando no se ve expresión de la proteína para la que codifica el plásmido utilizado, surgen varias preguntas inevitables: ¿por qué?, ¿qué es lo que no ha funcionado?, ¿el vector? ¿el medio?, ¿las condiciones?, ¿las células utilizadas?, ¿es un problema de incapacidad para atravesar la membrana celular?, ¿será que el vector es adecuado y ha compactado, protegido y transportado el DNA al interior celular, pero no ha podido liberarlo una vez dentro?, ¿o lo ha liberado pero las DNA-asas lo han degradado, porque no lo ha hecho en el momento oportuno y en el entorno adecuado?, o...???? La principal conclusión es que son muchas las variables que intervienen en el proceso, demasiadas quizás, y se tiene un escaso o nulo control sobre las que están directamente relacionadas con todo lo que suceda en el interior celular. A ello se une que el esfuerzo de la comunidad científica en este campo ha estado y está esencialmente dedicado a entender y controlar todas las primeras etapas, compactación y transporte, pero poco (comparativamente) se ha hecho en investigar a fondo el final del proceso de transfección, es decir, la liberación y expresión proteica. A esta realidad se añade, además, el hecho de que hasta no hace mucho tiempo, las primeras etapas estaban más en manos de químicos físicos y químicos orgánicos o inorgánicos, mientras que las últimas son terreno ineludible de bioquímicos y biólogos moleculares. Y es una realidad indiscutible que el avance en el conocimiento y control del proceso de transfección celular con vectores de material genético pasa por un planteamiento claramente multidisciplinar que aúne esfuerzos y conocimientos de químicos orgánicos o inorgánicos que diseñen y sintetizen los

vectores, químicos físicos que caractericen apropiadamente los complejos que éstos forman con los ácidos nucleicos y que, basados en esa caracterización, puedan indicar al bioquímico cuáles son las condiciones óptimas del vector y del complejo para probar la transfección celular, primero *in vitro*, y, finalmente *ex vivo* o *in vivo*.

Ante este escenario, la Tesis Doctoral que presento pretende, en términos generales:

- encontrar nuevos vectores no virales, que sean eficaces en la transfección celular y poco citotóxicos para las células, y que, por tanto, representen una alternativa viable y real a los vectores víricos, abriendo nuevas vías de potencial curación.
- encontrar nuevos agentes terapéuticos: el silenciamiento génico. La compactación y transfección celular basada en plásmidos de DNA ha dado paso en los últimos años al bloqueo o silenciamiento de la secuencia defectuosa, haciendo uso de pequeños fragmentos de siRNA (gene silencing).
- mejorar el conocimiento del efecto que la corona de proteínas que se adhiere al vector y/o complejo vector-agente terapéutico en contacto con fluidos biológicos (esencialmente, suero sanguíneo) pueda tener en el éxito o fracaso del proceso de transfección.

Es decir, esta Tesis pretende avanzar en el conocimiento y control de los dos escenarios en que se podría desglosar el proceso completo de transfección: el que alberga todos los procesos previos a la entrada en el entorno celular y el que tiene lugar dentro de la célula (ver Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Escenarios extra e intracelular del proceso de transfección.

# CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES Y  
ESTADO ACTUAL

## **2.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL**

---

### **2.1 Introducción: ¿Qué es la Terapia Génica y cuál es su problemática?**

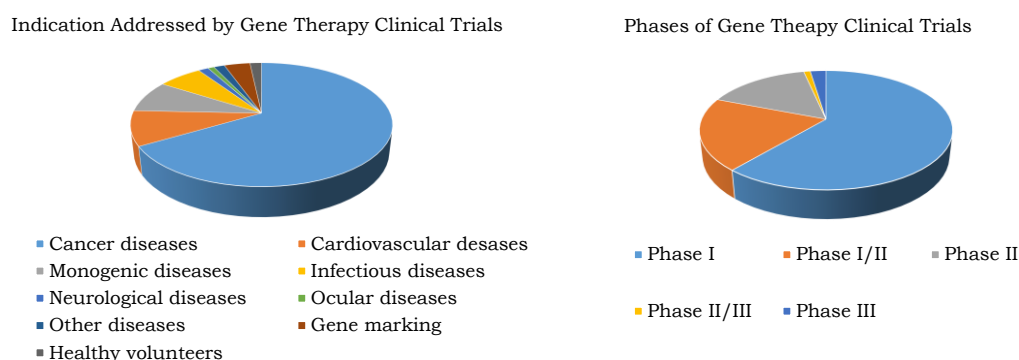
Gran parte de la población mundial padece a lo largo de su vida alguna enfermedad de origen genético. Entre estas enfermedades se pueden incluir las cardiovasculares (arterioesclerosis, trombosis, etc.), neurológicas (Alzheimer, Parkinson, etc.), desórdenes neuromusculares, ciertos cánceres, y otras como, fibrosis quística o hemofilia. La causa de estas enfermedades reside en la expresión defectuosa de ciertos genes funcionales, lo cual puede provocar que la síntesis de la proteína correspondiente se detenga, o genere una nueva proteína diferente a la esperada y, por tanto, con propiedades totalmente distintas. Todas estas enfermedades podrían ser curadas si se consiguiera que las células sintetizaran las proteínas convenientes, perdidas o mutadas, una vez se hubiese transportado el gen apropiado.

A este respecto, la industria farmacéutica invierte todos los años cantidades ingentes de dinero y recursos en tecnologías para el desarrollo de nuevos fármacos con rendimientos potencialmente muy altos, poniendo a punto estrategias muy sofisticadas que no pueden apoyarse simplemente en el diseño de un único fármaco candidato por cada diana escogida. Este hecho es, precisamente, lo que convierte a los ácidos nucleicos en una atractiva fuente de agentes terapéuticos. Su particular relación estructura-actividad y su modo de acción altamente específico permiten, teóricamente, utilizar la sorprendente maquinaria celular en una forma predecible para, bien estimular, o silenciar la expresión de, virtualmente, cualquier proteína, con una reducida toxicidad y menores efectos secundarios que muchos fármacos convencionales.

Estas cualidades son la base de la Terapia Génica, una tecnología altamente prometedora en la práctica médica que tiene por objetivo primordial tratar las enfermedades, tanto las hereditarias como las adquiridas, a nivel molecular. En el caso de las hereditarias, reparando posibles daños del DNA celular, y, sobre todo, impidiendo que estos se produzcan, mediante la inserción y expresión de genes funcionales en el interior de una célula viva, donde se espera que desempeñen la función prediseñada. Cuando la enfermedad es adquirida (como en el caso de muchos cánceres y enfermedades infecciosas), otra vía alternativa supone la inserción del gen, no con el objeto de reemplazar el material defectuoso, sino con la idea de bloquear o silenciar su función. En el primero de los casos, el reto es introducir un plásmido de DNA adecuado (de varios miles de pares de bases) en el citoplasma celular, mientras que la segunda aproximación se basa en la inserción de RNAs pequeños de interferencia (small interfering RNA o siRNA). Ambas aproximaciones son afrontadas en el presente proyecto.

La terapia génica apareció en la década de los setenta cuando se desarrolló el cultivo de líneas celulares de mamíferos y surgió la idea de introducir en ellas DNA exógeno de manera permanente, estable, funcional y capaz de heredarse, a fin de proveer nuevas funciones genéticas. Sin embargo, el pobre desarrollo de la biología molecular y las polémicas relacionadas con los principios éticos en las investigaciones, impidió obtener resultados importantes en ese momento. Esto no ocurrió hasta el desarrollo de los vectores retrovirales de primera generación y el avance en los principios legales pertinentes. A principios de la década de los 90, se realizaron los primeros ensayos clínicos, usando vectores retrovirales para introducir copias del gen adenosina deaminasa (ADA) en linfocitos T en un paciente con deficiencia de ADA.<sup>1</sup> A partir de ese momento, la terapia génica tuvo un gran auge que culminó con la mejora de la capacidad inmune de un grupo de niños franceses que sufrían inmunodeficiencia combinada severa.<sup>2,3</sup> Algunos de estos niños acabó desarrollando leucemia, ya que al introducir el DNA mediante retrovirus, éste se pudo integrar en oncogenes y activarlos. Fue entonces cuando se la empezó a considerar como una terapia de futuro con incalculables aplicaciones, siempre que pudieran eliminarse o reducirse los efectos secundarios.

A partir de esa época hasta ahora, se han realizado una gran cantidad de ensayos clínicos dirigidos a una amplia gama de enfermedades, estando la mayor parte de ellos en las fases I y II del proceso.<sup>4</sup> Estas fases I y II implican encontrar la mejor forma de administración así como la evaluación de los efectos secundarios (Figura 2.1). Sin embargo, aún hay muchas lagunas de conocimiento y aspectos en los que es necesaria una comprensión científica más profunda, por lo que se requiere un mejor entendimiento de los principios moleculares que gobiernan las enfermedades, el desarrollo de sistemas que permitan introducir el material genético dentro de las células de manera selectiva, eficiente y segura, así como una clara comprensión de los procesos de transfección en estudios *in vivo*. Todo esto permitirá que en un futuro la utilización de genes y ácidos nucleicos como fármacos sea una realidad con incalculables aplicaciones terapéuticas.



**Figura 2.1.** Ensayos clínicos basados en terapia génica y fases en la que se encuentran.

La idea central, por tanto, de la terapia génica se basa en la utilización de ácidos nucleicos a modo de fármacos capaces de: i) reemplazar y reparar, o ii) bloquear o silenciar una función patogénica celular específica asociada a un gen diana. Esta acción de silenciar la función de un gen defectuoso se conoce como “silenciamiento génico” (*gene silencing*) y se basa en la idea de que un gen que supuestamente debería expresarse a nivel celular, es “desconectado”, “apagado”

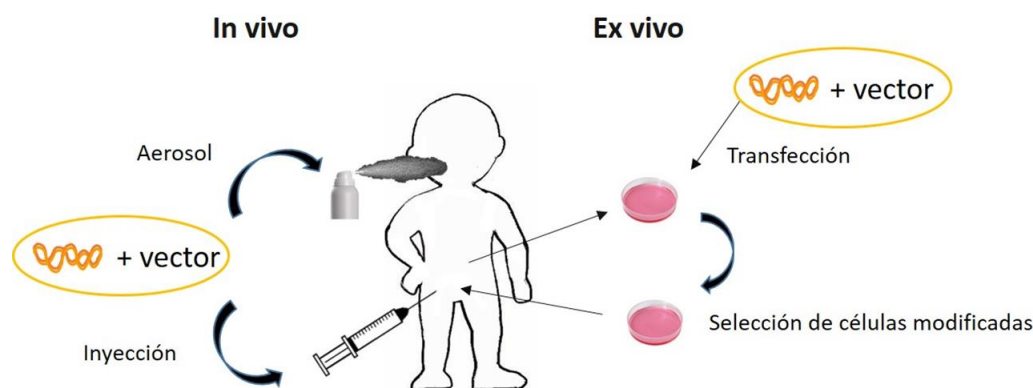


(silenciado) en la célula mediante una metodología adecuada, de tal forma que se paraliza la expresión de la proteína patogénica correspondiente. Por tanto, en contraste con la medicina convencional, que centra normalmente su objetivo en el tratamiento de los síntomas clínicos, la medicina génica proporciona un tratamiento basado en ácidos desoxirribonucleicos (DNA) o ácidos ribonucleicos (RNA), es decir, a un nivel de expresión génica intracelular. Este planteamiento de curar enfermedades corrigiendo ciertos patrones de expresión génica a nivel molecular ha despertado en los últimos tiempos un incomparable interés.

De las dos aproximaciones anteriormente propuestas, la primera (basada en la sustitución de material genético defectuoso por genes funcionales adecuados) ha sido más desarrollada, y existen en la literatura un amplio número de publicaciones y *reviews* que dan cuenta de las distintas formas de llevar a cabo tal reemplazo y reparación. Sin embargo, el segundo planteamiento (bloqueo o silenciamiento de genes patogénicos) está recibiendo en la actualidad un creciente interés como vía alternativa de ataque, sobre todo en el diseño de terapias de tratamiento de enfermedades como la hepatitis, cáncer, infecciones víricas, enfermedades respiratorias, cardiovasculares, neuronales y autoinmunes.

El éxito del proyecto genoma humano y el conocimiento cada vez más profundo sobre la secuenciación genómica en relación a la causa molecular de las enfermedades, ha hecho que los científicos viesan en este campo de la terapia génica una forma prometedora de curar enfermedades hasta ahora inabordables.

La terapia génica, en sus dos posibles planteamientos (transfección y silenciamiento), se puede llevar a cabo a través de dos vías, *ex vivo* e *in vivo*. En el procedimiento *ex vivo*, la administración de los ácidos nucleicos se realiza fuera del cuerpo del paciente; para ello, se obtiene una biopsia del órgano de interés, se expanden las células mediante cultivo celular y se ponen en contacto con el ácido nucleico mientras están siendo cultivadas. Esto hace posible seleccionar las células que hayan sido modificadas genéticamente y re-introducirlas en el paciente, manteniendo un mayor control del proceso, lo que generalmente conduce a mayores porcentajes de éxito. En el tratamiento *in vivo*, el ácido nucleico se suministra directamente al individuo enfermo por cualquiera de las vías habituales (intramuscular, oral, intravenosa, o subcutánea). Sin embargo, los riesgos y obstáculos que presenta este procedimiento son mucho mayores, y por tanto, suelen presentar una eficacia global mucho menor.<sup>5</sup>



**Figura 2.2.** Esquema los tratamientos *in vivo* y *ex vivo*.

Estos dos procedimientos se podrían utilizar en diferentes tipos de células, pudiendo diferenciar dos tipos de terapia génica: la somática y la germinal. La diferencia reside en el tipo de células donde se realiza la inserción del gen. Si las células son un óvulo o un espermatozoide, estaríamos ante la terapia génica germinal, mientras que si no lo son, hablamos de terapia génica somática. Todos los ensayos clínicos realizados hasta ahora en humanos han sido mediante terapia génica somática, ya que la germinal, al implicar cambios que se transmiten a la descendencia, es una vía que está prohibida en humanos por la legislación vigente.<sup>6,7</sup>

De todas las etapas del tratamiento de cualquier enfermedad mediante un protocolo de terapia génica: (1) diagnóstico de la enfermedad y conocimiento de las células diana; 2) síntesis en el laboratorio de los plásmidos, pDNA (segmento de DNA independiente capaz de replicarse); 3) transfección génica efectiva y segura al interior de la célula; y 4) expresión génica, i.e. síntesis de la subsiguiente proteína codificada por la célula, las dos primeras son procesos plenamente desarrollados y controlados. Sin embargo, la inserción selectiva, eficaz y segura de genes en la célula diana constituye la etapa más problemática de estos tratamientos, sobre todo cuando ésta se lleva a cabo *in vivo*.<sup>8</sup>

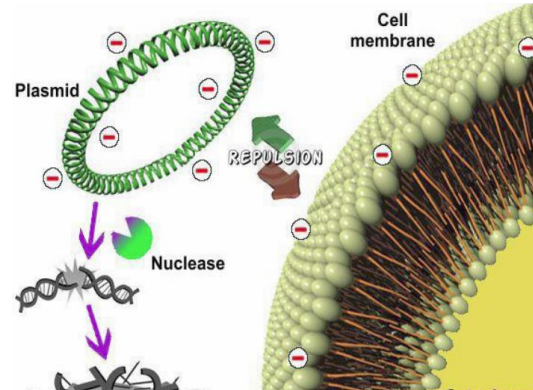
La razón es que la introducción de ácidos nucleicos al interior de las células, tanto en la terapia génica *in vivo* como *in vitro*, presenta una serie de barreras fisiológicas que impiden una eficiente transfección. La trayectoria de los ácidos nucleicos hasta el interior celular no es un proceso sencillo, ya que, en general, todos los sistemas biológicos siempre intentan destruir cualquier “entidad” extraña que penetre en su interior. Las principales barreras con las que se encuentran los ácidos nucleicos son las siguientes:

- i) Captación de los ácidos nucleicos por el sistema endotelial.
- ii) Interacciones no específicas con los componentes de la sangre.
- iii) Internalización de los ácidos nucleicos en las células.
- iv) Liberación oportuna de los ácidos nucleicos en el interior de la célula.
- v) Llegada de los ácidos nucleicos al compartimento celular adecuado.

Estos impedimentos o barreras son especialmente importantes cuando la transfección se realiza *in vivo*. En este caso, el primero de los problemas es la

captación del ácido nucleico por parte del sistema endotelial y su posterior filtración en el riñón, provocando una pérdida total en el tratamiento.

Otro de los problemas asociados a la terapia *in vivo*, son las interacciones inespecíficas con los diversos componentes de los fluidos biológicos. La sangre presenta una gran cantidad de proteínas y enzimas que interaccionan de manera destructiva con los ácidos nucleicos. Cuando el ácido nucleico (ya sea desnudo o protegido) entra en el torrente sanguíneo, una gran cantidad de proteínas se adhieren a su superficie formando lo que se conoce como la corona de proteínas. Dentro de las proteínas que forman esta corona, se encuentran las opsoninas, las cuales funcionan como coadyuvantes de los fagocitos en el sistema de respuesta inmune. Cuando estas proteínas se adhieren al sistema que lleva los ácidos nucleicos, desencadenan una serie de señales para que el sistema sea fagocitado, reduciendo así drásticamente la eficiencia de transfección.



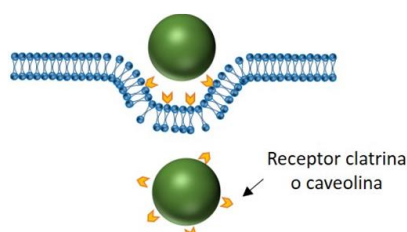
**Figura 2.3.** Representación esquemática de las limitaciones farmacocinéticas de terapias génicas basada en ácidos nucleicos desnudos.

Por otra parte, la presencia de nucleasas en el suero de la sangre provoca la ruptura de los enlaces fosfodiéster entre la pentosa y el grupo fosfato de los ácidos nucleicos, provocando su degradación y consecuente pérdida de actividad biológica (Figura 2.3).

Una vez el ácido nucleico ha alcanzado la superficie celular, se encuentra con la siguiente barrera: la membrana celular. Primero, porque la entrada de moléculas al interior de una célula se hace de manera selectiva siguiendo algunos de los procesos que se detallarán más adelante; y segundo, porque tanto las membranas celulares como los ácidos nucleicos están cargados negativamente, generándose repulsiones electrostáticas entre ambos (Figura 2.3).

Debido a las barreras anteriormente mencionadas, en un proceso de transfección se evita introducir ácidos nucleicos desnudos en las células. En la mayoría de los casos, se usan sistemas que protegen el ácido nucleico y favorecen su internalización celular; son los *vectores génicos*, cuyo diseño, síntesis, caracterización y evaluación son el objeto central de la Tesis Doctoral que se presenta.

La internalización de los ácidos nucleicos al interior de la célula no ocurre de manera pasiva, sino que tiene lugar, principalmente, a través de diferentes vías de endocitosis. La endocitosis es un proceso por el cual la célula introduce partículas grandes en su interior, y lo hace por medio de una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula llamada endosoma, la cual termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma. Se ha demostrado que las tres vías de endocitosis seguidas en los procesos de transfección son: endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina,



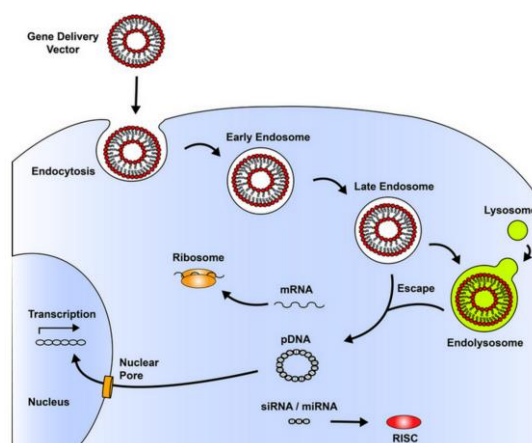
**Figura 2.4.** Mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

endocitosis mediada por caveolas y endocitosis mediada por vesículas no recubiertas (Figura 2.4). La endocitosis mediada por clatrina es el principal mecanismo de internalización en las células de mamíferos. La endocitosis mediada por caveolina es la vía usada por patógenos. En ambas vías, cuando se produce la invaginación, los endosomas están revestidos de clatrina o caveolina respectivamente. De esta forma, cuando

entra el ácido nucleico al interior de las células lo hace dentro de un endosoma. La habilidad de los sistemas de transporte de ácidos nucleicos de unirse a la membrana celular y penetrar en ella por alguna de las vías antes mencionadas dependerá de varios factores, como de la composición del sistema de transporte y/o del tamaño que presente. Finalmente la vía de entrada también determinará considerablemente la eficiencia de la transfección.

Una vez internalizado el ácido nucleico en los endosomas, debe ser capaz de liberarse del vector que lo porta (disociación del complejo nanovector: ácido nucleico) al citoplasma y dirigirse al orgánulo de interés, por ejemplo al núcleo celular para el caso de los plásmidos. Se cree que la liberación de los ácidos nucleicos se produce por la acidificación de los endosomas cuando se fusionan con los lisosomas (orgánulos celulares vesiculares que contienen enzimas hidrolíticas y proteolíticas que sirven para digerir materiales de origen externo, con pHs del orden de 4,8). La fusión de los endosomas a los lisosomas puede provocar daños y degradación de los ácidos nucleicos, por lo que la velocidad a la que los ácidos nucleicos logren salir del endosoma formado y dirigirse al compartimento adecuado, también es un punto crucial en el proceso (Figura 2.5).

De todo lo anteriormente expuesto, se puede inferir que los procesos de transfección celular son tremendamente complejos, ya que confluyen un importantísimo número de variables extra e intracelulares. Por consiguiente, para poder conocer en profundidad los mecanismos que regulan la transfección celular, es imprescindible plantear estudios claramente multidisciplinarios que aúnen los esfuerzos de varios científicos expertos en distintas áreas del conocimiento como son la física, la química, la bioquímica y la medicina. Sólo de esta forma se podrá conseguir diseñar e implementar nuevos protocolos de terapia génica que mejoren los ya existentes, y que puedan curar enfermedades a nivel molecular de forma eficiente y segura. Éste es el planteamiento y el fin último de la Tesis Doctoral que se presenta.



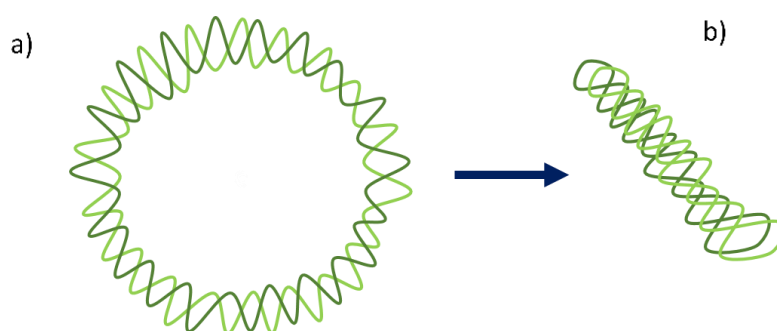
**Figura 2.5.** Representación esquemática de los obstáculos que se presentan en el proceso de transfección.

## 2.2 Agentes terapéuticos usados en terapia génica: ácidos nucleicos.

La elucidación del genoma humano ha permitido saber qué genes están implicados en una determinada enfermedad, gracias a lo cual, se pueden desarrollar terapias basadas en los ácidos nucleicos donde se reemplaza o silencia el gen dañado. Una de las mayores ventajas de usar los ácidos nucleicos como agentes terapéuticos es su reconocimiento selectivo de dianas moleculares y las rutas que siguen, lo que les confieren una enorme especificidad de acción. En la actualidad existe un gran número de agentes terapéuticos basados en diferentes tipos de ácidos nucleicos, que pueden clasificarse en ácidos nucleicos codificantes (secuencias de DNA que presentan la información requerida para la síntesis de *novο* de una proteína) y ácidos nucleicos no codificantes o interferentes (que no incluyen información para codificar proteínas, sino que interfieren en la síntesis de alguna proteína específica en alguno de los niveles: traduccional, transcripcional o post-transcripcional), como ribozimas, DNAzimas, pequeños RNAs de interferencia o aptámeros). Es decir, los no codificantes contienen el DNA regulador que controlan cuándo, cuánto y dónde se produce el proceso de transcripción de un gen.

Se han utilizado ambos tipos de ácidos nucleicos en pruebas clínicas para el tratamiento de un amplio abanico de enfermedades, tales como el cáncer, VIH, desórdenes cardíacos y neurológicos (como el Parkinson y Alzheimer).<sup>9</sup> La elección del tipo de ácido nucleico a usar como fármaco dependerá del tipo de desorden genético que se desee tratar. Si lo que se requiere es la expresión de una proteína específica que revierta los daños provocados por su falta, se recurre a una terapia génica basada en secuencias codificantes de DNA introducidas con plásmidos. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico capaces de replicarse y transcribirse de manera independiente al DNA cromosómico. Están presentes

normalmente en el citoplasma de bacterias (organismos procariotas), aunque en ciertas ocasiones pueden estar también en eucariotas. Su tamaño varía desde 1 a 250 kb. El número de plásmidos puede variar, dependiendo de su tipo, desde una sola copia hasta algunos cientos por célula. Su mecanismo de acción pasa por tener acceso al núcleo una vez han atravesado el citoplasma, por lo que la mayor o menor capacidad de alcanzar el núcleo determinará la mayor o menor eficacia del proceso de transfección celular. Además de su uso en enfermedades genéticas, los plásmidos se pueden usar como vacunas de DNA para la inmunización genética.<sup>10</sup> El término *plásmido* fue presentado por primera vez por el biólogo molecular J. Lederberg en 1952. El primer protocolo aprobado utilizando un plásmido se llevó a cabo en 1990 para el tratamiento de la deficiencia de la adenosin deaminasa y desde entonces se han probado e implementado más de 500 protocolos diferentes.<sup>11</sup> En su forma más simple, un plásmido requiere un origen de replicación bacteriano, un gen resistente a antibiótico y al menos un sitio de reconocimiento de enzima de restricción única. Los plásmidos tienen una conformación variable que puede ser lineal o circular, aunque adoptan con frecuencia conformaciones superenrolladas (*supercoiled*) en medios fisiológicos (Figura 2.6), con importantes implicaciones en su densidad de carga negativa, ya que son capaces de retener cierto porcentaje de contraiones en su superficie, como se verá más adelante. Los plásmidos son relativamente fáciles de manipular a nivel molecular, es decir, se les puede introducir secuencias codificantes de manera sencilla. Estas dos características, autorreplicación y facilidad de manipulación, hacen de los plásmidos un sistema idóneo para usar en la terapia génica basada en DNA. Sin embargo, aún existen ciertas limitaciones asociadas a su uso, ya que, además de transportar las secuencias codificantes de interés, los plásmidos contienen una serie de elementos que provocan señales regulatorias de la expresión génica como promotores y amplificadores de secuencias. Dichos elementos pueden generar efectos secundarios negativos como la modificación del proceso de transcripción génica, evitando o dificultando una transfección eficiente, y/o el desarrollo de una posible respuesta inmune. Por consiguiente, la ingeniería genética de plásmidos tiene que trabajar en la obtención de promotores capaces de reconocer e insertarse en el genoma humano de manera eficiente y en el desarrollo de secuencias que no provoquen respuesta inmune. En esta tesis se usará el plásmido pEGFP-C3 pDNA, que codifica para la expresión de la proteína GFP, así como el plásmido pCMV-Luc VR1216, que codifica para la expresión de la proteína luciferasa.



**Figura 2.6.** Un plásmido en sus formas a) relajada y b) superenrollada

Por otra parte, como ya se ha comentado con anterioridad, los protocolos de terapia génica más novedosos están basados en un cambio de estrategia con



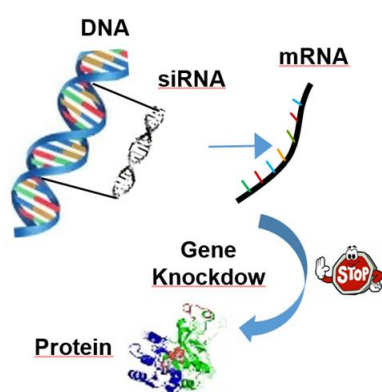
respecto a la compactación y transfección de plásmidos de DNA. En vez de reemplazar el material genético, se intenta bloquear o silenciar una función patogénica celular específica asociada a un gen diana. Esta acción de silenciar la función de un gen defectuoso es conocida como silenciamiento génico, que, a menudo, se confunde con la eliminación de genes (*gene knockout*). Hay que distinguir entre una reducción en la expresión génica (silenciamiento, decaimiento, apagamiento) y la eliminación o borrado total de unos genes determinados del genoma del organismo, con la consiguiente eliminación o anulación de su expresión. En el primero de los casos, la expresión del gen se puede reducir hasta un 70%, pero no se elimina por completo. En general, los métodos de silenciamiento génico están mejor considerados que los de eliminación, puesto que permiten a los investigadores estudiar genes esenciales en los organismos para sobrevivir y que, por tanto, no pueden ser eliminados. Entre los diferentes métodos de silenciamiento génico conocidos, esta Tesis Doctoral se centra en el que utiliza RNAs de interferencia. Se trata de un proceso natural utilizado por las células para regular la expresión génica y controlar el flujo de la información genética, descubierto en 1998 por Andrew Fire y Craig Mello, quienes obtuvieron por ello el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2006. Nuestro genoma opera enviando instrucciones para la manufactura de proteínas desde el DNA en el núcleo de la célula hasta la maquinaria sintetizadora en el citoplasma. Estas instrucciones están transportadas por el RNA mensajero (mRNA), que hace las veces de intermediario en la circulación de la información genética del DNA a las proteínas. Fire y Mello encontraron un mecanismo que puede degradar el mRNA de un gen específico bloqueando de forma eficaz la síntesis de proteínas.

Esencialmente, la interferencia por RNA, RNA de interferencia o iRNA, es un proceso de silenciamiento génico mediado por moléculas de RNA que tiene gran importancia en procesos de desarrollo y diferenciación celular, cáncer y defensa frente a virus y frente a la propagación de transposones. Efectivamente, hay ciertas enfermedades producidas por la sobreexpresión de algún gen, donde el uso del RNAs de interferencia ha favorecido un enorme progreso en su investigación.<sup>12</sup> Actualmente numerosas técnicas de biología molecular empleadas en investigación básica y terapia se basan en este proceso.

Los RNA interferentes son fragmentos cortos (en torno a 19-25 pares de bases o bp) de RNA de doble hebra obtenidos bien a partir de la fragmentación enzimática (*RNAse III*) de RNA largo de doble hélice (dsRNA) o mediante métodos de síntesis química. Se pueden clasificar según su procedencia en dos grandes grupos: los microRNA (miRNA) y los pequeños RNA interferentes (*small interfering RNA*) (siRNA). Las siRNA tienen origen exógeno mientras que las microRNA están codificados en el genoma de la célula. Existe un tercer grupo que incluye los piRNA (*Piwi-interacting RNAs*, RNAs asociados a Piwi).

El proceso de siRNA es un proceso complejo donde participan numerosas proteínas pertenecientes a distintas familias y existen distintas modalidades según estén implicadas moléculas de siRNA o de microRNA. El mecanismo mejor caracterizado es aquel que se inicia con la incorporación a la célula de una molécula larga de RNA de cadena doble, conocida como dsRNA (*double-stranded RNA*). Los dsRNAs pueden ser de origen endógeno (por ejemplo los transcritos generados a partir de secuencias de DNA repetidas en tándem o RNA procedente

de elementos genéticos móviles), o de origen exógeno (como virus o transgenes). En el citoplasma, la molécula de dsRNA es reconocida por la enzima Dicer que la fragmenta en pequeñas moléculas de cadena doble, los siRNA (fragmentos cortos, en torno a 20 bp, que también pueden ser obtenidos mediante métodos de síntesis química). Cada molécula de siRNA es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complejo separa las dos hebras de la molécula de siRNA quedándose una de las hebras incorporada en el complejo. Pese a que los fragmentos producidos por Dicer son de doble hebra y en teoría ambas hebras podrían producir un siRNA funcional, sólo una de las dos hebras (la *antisense*), denominada la hebra guía, dirige el proceso de degradación del RNA mensajero (mRNA) complementario. La otra hebra (la *sense*), denominada *hebra pasajera*, es degradada durante el proceso de activación de RISC. De esta manera, la *hebra guía* que queda en el complejo es usada como molde para reconocer a la molécula de mRNA, y, si la complementariedad con la molécula de mRNA diana es perfecta, el complejo RISC degrada este mRNA. El componente activo del complejo RISC es una proteína de la familia de las endonucleasas denominadas Argonautas, que corta la hebra de mRNA diana complementaria al siRNA que está asociado a RISC. Las dos mitades del mRNA son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen.<sup>12</sup> La Figura 2.7 muestra un esquema del proceso:



**Figura 2.7.** Esquema del mecanismo del siRNA.

Varias publicaciones recientes muestran éxitos en silenciamientos de genes en células humanas y en animales. Por ejemplo, recientemente se ha mostrado el silenciamiento de un gen que causa altos niveles de colesterol en sangre tratando animales con RNAs silenciadores<sup>13</sup>. También hay planes para desarrollar siRNA para el tratamiento de infecciones virales, trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes endocrinos y muchas otras enfermedades.<sup>14</sup> Este método también se ha convertido en una herramienta importante de investigación en biología y biomedicina. En el futuro, es de esperar que pueda utilizarse en muchas disciplinas, incluida la agricultura. La interferencia de RNA también está siendo ampliamente utilizada en ciencia básica, como método para estudiar las funciones de los genes y para implementar nuevos protocolos de terapia génica en el futuro. Se abre todo un nuevo campo de investigación con un gran potencial. Por ello, uno de los objetivos más ambicioso de esta Tesis Doctoral se centra en la caracterización biofísica y evaluación bioquímica de lipoplejos formados por siRNA y CLs.



Tanto el DNA como el RNA son polielectrolitos con una elevada densidad de carga negativa, lo cual limita severamente su transporte a través de las membranas celular y nuclear, de gran permeabilidad pero también cargadas negativamente, hacia el interior del núcleo, principal objetivo de la terapia génica. Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, el organismo contiene DNA-nucleasas, enzimas capaces de degradar DNA libre extracelular como medida de protección frente a DNA patógeno. La transfección *in vivo* adquiere así una mayor problemática en el caso de la administración sistémica.

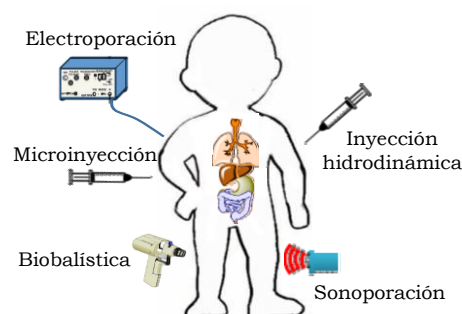
Consecuentemente, es necesario disponer de sistemas capaces de compactar o condensar los fragmentos de ácidos nucleicos, y transportarlos a través de la membrana celular, protegiéndolos de cualquier agente destructor o degradante, y, finalmente, liberarlos en el entorno celular adecuado para que desempeñen su función terapéutica. A estos sistemas, conocidos como vectores (o vehículos) génicos, se les dedica el siguiente apartado.

### **2.3 Métodos de vehiculización del material genético: vectores génicos.**

Los fármacos convencionales consisten en especies bioactivas y un vehículo o vector, siendo las primeras el foco de atención en las estrategias de diseño. Sin embargo, en el caso de los fármacos biomoleculares, como es el caso de los ácidos nucleicos, el vector o vehículo terapéutico se convierte en el protagonista decisivo, ya que les permiten superar las barreras fisiológicas alcanzando su diana de una forma totalmente funcional para desempeñar su cometido terapéutico. No se debe olvidar que los ácidos nucleicos son fácilmente degradados (baja viabilidad) por las nucleasas presentes en los fluidos biológicos, y sus capacidades para atravesar la membrana plasmática y ser internalizados por las células están seriamente limitadas por su gran tamaño, su rigidez y su carga negativa. Por consiguiente, si bien en sus primeros desarrollos la terapia génica tanto *in vivo* como *in vitro* se realizaba con DNA desnudo, en seguida se desarrollaron un gran número de formas para vehiculizarlos al interior de las células.

Se conocen en la actualidad numerosos métodos de transfección génica, si bien la mayoría de ellos han demostrado poca eficiencia y/o son sólo aplicables *in vitro*. Aunque se suelen clasificar de diversas formas, en esta Tesis se van a agrupar esencialmente en dos categorías: métodos físicos y métodos asistidos por vectores (químicos o biológicos).

Los métodos físicos son aquellos que utilizan estímulos mecánicos o eléctricos para promover la captación del ácido nucleico terapéutico en la célula o tejido diana. Incluyen la microinyección, biobalística, electroporación, ultrasonidos, gradiente de presión y radiación láser (Figura 2.8). Estos métodos, a pesar de ser operativamente sencillos, presentan ciertas desventajas, como son: bajos niveles de transfección, limitada cantidad de DNA transportable a las células, distribución no homogénea del DNA en las células y la alta citotoxicidad, ya que, en muchos de los casos estos métodos pueden provocar daños celulares irreversibles. De todos los métodos físicos y mecánicos, sólo la inyección directa de DNA desnudo en células musculares de extremidades en ratones y posteriormente en melanoma también de ratón, ha demostrado una cierta efectividad en estimulación inmunológica *in vivo*.



**Figura 2.8.** Métodos físicos usados en la terapia génica.

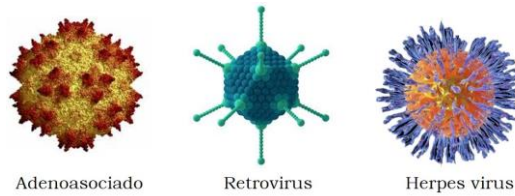
Por otro lado, los métodos asistidos por vectores, son aquellos en los que se utiliza un agente biológico o químico para transportar los ácidos nucleicos al interior de las células. Estos vectores, además de proveer protección a los ácidos nucleicos, deben reunir una serie de características para su uso potencial como agentes de transfección eficientes:

- Fáciles de producir y almacenar
- Coste de producción razonable
- Resistencia a la degradación
- Inmunológicamente inertes
- Gran capacidad de compactación de material genético de amplio rango de tamaño (entre 350 a 12000 pares de bases)
- Especificidad en los tejidos
- Favorecer la integración y replicación de la secuencia introducida
- Bajos niveles de toxicidad y/o efectos secundarios mínimos.

Sin embargo, aún no se conoce ningún sistema que cumpla con todos estos requisitos, sino que, como se verá más adelante, cada tipo de vector presenta ventajas y desventajas.

El método biológico más extendido actualmente, tanto en tratamientos *ex vivo* (extracción de las células elegidas, cultivo *in vitro* y posterior reinserción de las células en el organismo) como en algunas aplicaciones *in vivo*, es la inserción de DNA vírico con algunas secuencias borradas o reconstruidas utilizando virus no infectivos. Son los conocidos vectores génicos virales. Fueron los primeros en ser utilizados, ya que los virus son capaces de manera natural de transportar material genético al interior de células huésped para su posterior replicación. Sin

embargo, para poder utilizar un virus en terapia génica, es necesario realizar ciertas modificaciones en su ciclo replicativo a fin de evitar que éste infecte a la célula objetivo y genere patogenicidad. Por esta razón, a los virus utilizados en terapia génica se les conoce como virus recombinantes o defectivos. Una vez modificado el virus, se procede a sustituir el genoma viral por el ácido nucleico

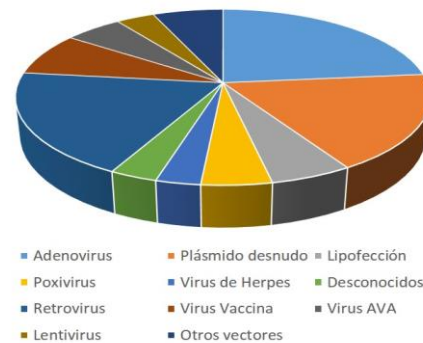


**Figura 2.9.** Algunos tipos de virus usados en terapia génica.

terapéutico. Desafortunadamente, las transformaciones en los virus han resultado ser bastante complejas y sólo los virus más simples (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), poxvirus, y el virus del herpes) han sido modificados exitosamente para su uso como vectores de transfección (Figura 2.9). Entre ellos, los vectores virales más usados

actualmente en terapia génica son los adenovirus (23% de todas las pruebas clínicas, ver Figura 2.10), ya que son capaces de transfectar células que no están en división y presentan una eficiencia de transfección en general superior y una respuesta inmune inferior que el resto de vectores virales.

Sin embargo, aunque durante muchos años se han encontrado niveles terapéuticamente relevantes de expresión génica utilizando vectores virales, y a pesar de que más de las dos terceras partes de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Figura 2.10) se han realizado con estos vectores, aún existen graves riesgos y limitaciones relativos a su aplicabilidad: i) pueden provocar efectos infecciosos y cancerígenos; ii) pueden inducir una respuesta inmune o inflamatoria, iii) eventualmente, su información genética podría insertarse en el genoma del huésped; y iv) la fabricación a gran escala, incluso de los virus más simples, aún no es posible. Por consiguiente, los problemas asociados a la transfección vírica hacen por el momento inviable este método de transporte génico.



**Figura 2.10.** Vectores usados en los diferentes ensayos clínicos de terapia

Esta situación ha provocado que el foco de atención en la comunidad investigadora de este campo se haya dirigido desde hace algún tiempo hacia el desarrollo e implementación de los métodos químicos, que superan a los biológicos en que no desencadenan los efectos adversos anteriormente mencionados, pero cuentan con la desventaja de presentar habitualmente altos niveles de citotoxicidad y una relativamente baja eficiencia en la transfección celular.

Brevemente, los métodos químicos se basan en combinar el DNA (o siRNA) con sistemas químicos capaces de condensarlo, neutralizándolo eléctricamente en una primera etapa, para posteriormente constituir globalmente una entidad

catiónica capaz de atravesar la membrana celular, liberando el material genético y promocionando por tanto la expresión génica adecuada en el interior del núcleo. Cumpliendo esas características, se pueden encontrar multitud de compuestos químicos, siendo los más desarrollados y utilizados los sistemas coloidales (lípidos catiónicos, CLs) y los sistemas poliméricos (policationes). Cabe destacar que estos polielectrolitos tienen la capacidad de cargarse en disoluciones ácidas, de tal manera que podrían condensar en medio ácido y descondensar el DNA una vez entrase en el citoplasma. En el primer caso, los complejos vector lipídico-DNA (o siRNA) reciben el nombre de *lipoplejos* y el proceso completo de compactación-transporte-liberación-expresión se denomina comúnmente *lipofección*; en el segundo caso, hablaríamos de *poliplexos* y *polifección*, respectivamente.

Otro tipo de sistemas capaces de vehiculizar los ácidos nucleicos al interior celular son las nanopartículas inorgánicas (NPs). Tienen la ventaja de un control relativamente sencillo de tamaños y prestaciones; deben ser funcionalizadas para cargarlas positivamente, requisito necesario para neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA o siRNA. Especial atención están recibiendo en los últimos tiempos las nanopartículas magnéticas (MNPs), por presentar la ventaja adicional de que el complejo MNP-DNA (o siRNA), también conocido como *magnetoplejo*, puede ser externamente dirigido por un campo magnético hacia su sitio de acción en el organismo, optimizando el proceso de transfección, en este caso también conocido como *magnetofección*.

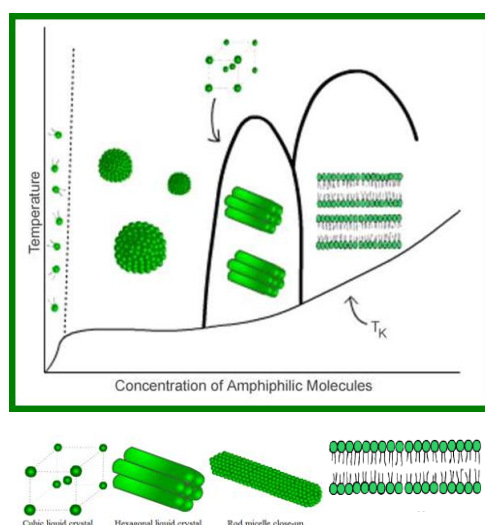
Recientemente, varios grupos de investigación, entre los que se encuentra el grupo de investigación al que pertenezco, han centrado su atención e interés en la compactación de DNA o siRNA con sistemas supramoleculares macrocíclicos (calixarenos, CDs anfifílicas, rotaxanos, pilararenos). Ciertamente, en todos los casos mencionados, la molécula presenta en su estructura cadenas hidrofóbicas más o menos largas y cargadas o no, por lo que su potencialidad como agentes de compactación electrostática del DNA se asienta en la capacidad de estos compuestos para estructurarse en autoagregados de tipo coloidal.

La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral se basa en el uso de métodos químicos (vectores génicos no virales); en particular, aquellos que portan en la estructura del vector una matriz lipídica. Esta matriz les permite autoagregarse en estructuras tipo cristal líquido liotrópico que presentan similitudes con las membranas plasmáticas, hecho que, se cree, puede ser la base de su potencial éxito como eficaces agentes de transfección. Los siguientes apartados describen los aspectos más relevantes de este tipo de vectores.

### 2.3.1 Vectores lipídicos.

Hasta ahora, los sistemas lipídicos han sido los más desarrollados y utilizados en experimentos *in vitro* debido a su menor toxicidad en comparación con los vectores virales, y a la baja o nula respuesta inmunitaria que producen.<sup>15</sup> En los últimos años, se han publicado en la literatura numerosos artículos y varios libros dirigidos al estudio de la capacidad de los sistemas coloidales lipídicos para compactar y transfectar DNA al interior celular, dada la similitud estructural entre las membranas celulares y la doble capa lipídica de este tipo de sistemas, de tal manera que por endocitosis, fusión y/o poración, se libera el DNA en el interior del núcleo.

Los vectores lipídicos están constituidos esencialmente por mezclas de moléculas anfífilas de muy variada estructura y propiedades. Como es sabido, toda molécula anfífila se caracteriza por presentar en su estructura una región polar, iónica o no, de carácter hidrofílico, formada por uno o más grupos polares, y una región apolar hidrofóbica formada generalmente por una o más cadenas hidrocarbonadas alifáticas. Una de las características más significativas de estas moléculas es su tendencia a autoagregarse en disolución acuosa mediante un proceso cooperativo, conducido por la tendencia de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas anfífilas a reducir su contacto con el agua,<sup>16,17</sup> con la concurrencia únicamente de un complejo balance de fuerzas intermoleculares no covalentes. Así, la formación de estos nanoagregados se ve favorecida por la supresión de las interacciones desfavorables entre las cadenas hidrófobas y el agua, mientras que las interacciones electrostáticas repulsivas entre los grupos polares y las interacciones estéricas que tienen lugar entre ellos y entre las cadenas hidrófobas,<sup>16-18</sup> constituyen esencialmente los factores que se oponen a la autoagregación. Como resultado de este fenómeno de autoasociación, se forman una amplia variedad de nanoagregados en la región diluida del diagrama de fases, que se transforman en fases de cristal líquido liotrópico (fases lamelares, hexagonales y cúbicas, descritas más adelante en esta Memoria) en regiones más concentradas de dicho diagrama (ver Figura 2.11). Estos nanoagregados son termodinámicamente estables y están en equilibrio químico dinámico con las moléculas anfífilas libres.<sup>17,19-21</sup> Además, pueden cambiar de forma o tamaño como respuesta a pequeños cambios en concentración, fuerza iónica, temperatura, pH y presión.<sup>22-24</sup>



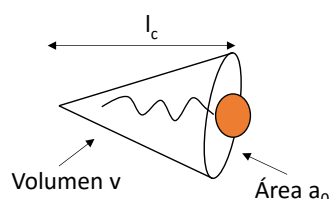
**Figura 2.11.** Diagrama de fases T vs. Concentración de sistemas anfílicos en disolución acuosa

La geometría de las distintas estructuras coloidales viene determinada por el valor del parámetro de empaquetamiento de Israelachvili,  $P$ , definido en función de las características geométricas la molécula anfífila:<sup>17,18,24,25</sup>

$$P = \frac{v}{l_c a_0} \quad (2.1)$$

donde  $v$  es el volumen de las cadenas hidrocarbonadas, asumiendo que son fluidas e incompresibles,  $l_c$  es la longitud crítica de la cadena hidrocarbonada, es

decir, la longitud máxima efectiva que pueden alcanzar las cadenas cuando forman parte del agregado coloidal, y  $a_0$  es el área efectiva de la cabeza polar en la superficie del agregado (Figura 2.12).



**Figura 2.12.** Representación esquemática de los parámetros moleculares de los que depende el parámetro de empaquetamiento, P

Los parámetros  $v$  y  $l_c$  se pueden estimar en función del número de carbonos de la cadena hidrocarbonada,  $n_c$ , haciendo uso del modelo propuesto por Tanford:<sup>16,26,27</sup>

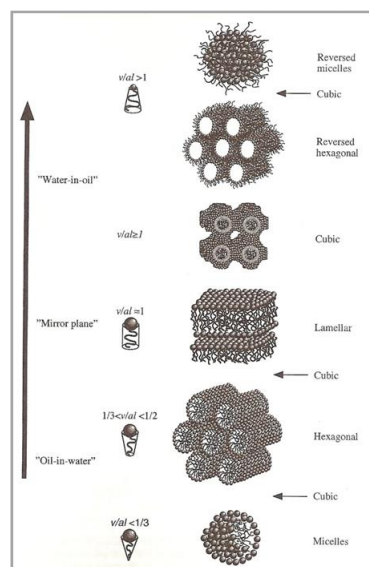
$$v = 0,027 + 0,0269n_c \quad (2.2)$$

$$l_c = 0,15 + 0,127n_c \quad (2.3)$$

Atendiendo sólo a estas consideraciones geométricas y dependiendo del valor del parámetro de empaquetamiento, P, las moléculas anfifílicas tienden a autoagregarse con geometrías diversas, resumidas en la siguiente Figura 2.13. Como se verá más adelante en esta Memoria, la mayor parte de los agregados mostrados en la figura, tanto los directos como los reversos, son interesantes en lo que a su potencial rol como vectores génicos se refiere.

En términos generales, se suelen utilizar moléculas anfifílicas de doble cadena para la formación de vectores lipídicos, ya que presentan muy baja solubilidad comparada con la de los de cadena sencilla. En otras palabras, la *concentración vesicular crítica*,  $cvc$ , es unas 105-106 veces menor que la concentración micelar crítica,  $cmc$ .<sup>24</sup>

La composición, así como la distinta naturaleza de las cadenas hidrocarbonadas y regiones polares de los lípidos, determinan muchas propiedades superficiales y de membrana, tales como la carga superficial, interacciones estéricas o la rigidez de la membrana.<sup>20,22</sup> Esta última propiedad cobra vital importancia a la hora de la preparación de los vectores lipídicos, y viene manifestada por la presencia de *mesomorfismo termotrópico*. Cada lípido se caracteriza por una *temperatura de transición* de fase termotrópica,  $T_m$ ;<sup>20</sup> por debajo de la  $T_m$ , los lípidos en la bicapa (así como una cierta cantidad de moléculas de agua) están altamente ordenados en estado gel, con las cadenas alquílicas en conformación *trans*. Sin embargo, por encima de la  $T_m$  se produce una simultánea disociación del entramado iónico por la entrada de moléculas de agua y la fusión de la región hidrofóbica,<sup>17,20,28</sup> es

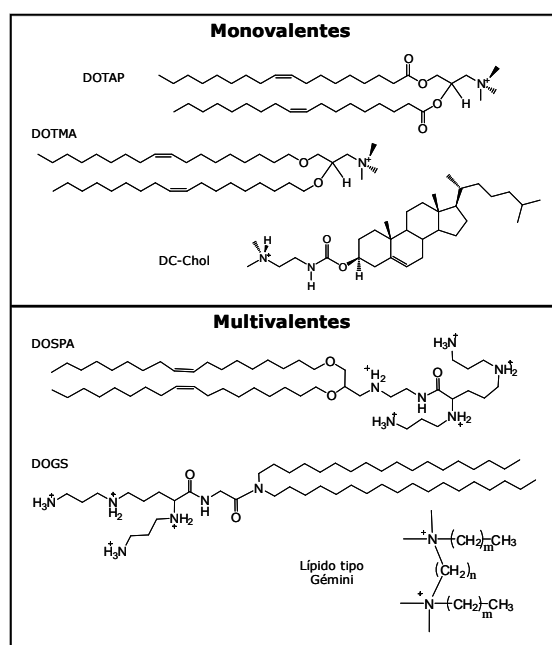


**Figura 2.13.** Geometrías de agregados coloidales en función del parámetro P

decir, un aumento del desorden, lo que convierte a la membrana en una estructura más flexible y dinámica. Estudios previos han demostrado que la presencia de lípidos no iónicos en sistemas lipídicos mixtos hace disminuir la  $T_m$  de la bicapa lipídica (membrana), todo lo contrario que los lípidos catiónicos.<sup>29,30</sup> Aunque quizás el factor más determinante en el valor de  $T_m$  es la presencia de lípidos en la mezcla con insaturaciones en una o las dos cadenas hidrofóbicas.

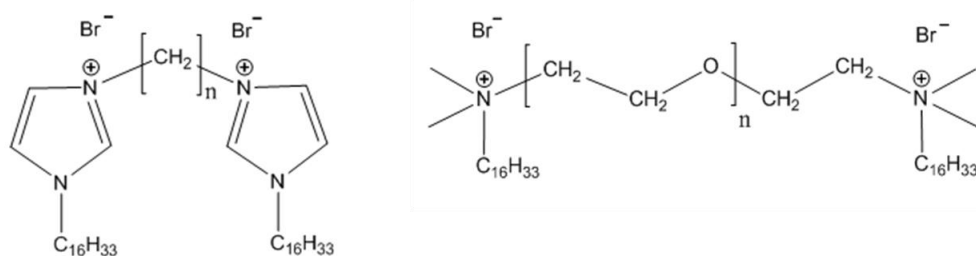
Dada la carga negativa de los ácidos nucleicos y la naturaleza esencialmente aniónica de las membranas celulares, los vectores lipídicos con mayor potencial, *a priori*, como agentes vehiculizadores de DNAs o siRNAs son los lípidos catiónicos, en adelante CLs. Los CLs están constituidos por cabezas cargadas positivamente de muy diversa naturaleza (amonio, imidazol, lisina y amina/poliaminas), unidas a cadenas hidrofóbicas de variada longitud. La superficie catiónica del liposoma resultante favorece la interacción electrostática espontánea con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA y con las de las membranas celulares en la captación celular. Además, los liposomas catiónicos protegen al DNA de la degradación por las enzimas DNAasas que se encuentran en los medios biológicos. Desde que el primer lípido catiónico (DOTMA) fue usado como vector de transfección, se ha trabajado con una gran variedad de CLs, tanto comerciales como de síntesis. Entre los lípidos más ampliamente estudiados se encuentran el DOTAP, DC-Chol, DOGS y el DOSPA (Figura 2.14). Sin embargo, en la literatura se pueden encontrar una gran cantidad de lípidos no comerciales con diferentes variaciones estructurales, diseñados y sintetizados para ser utilizados como vectores génicos.

Particular interés han cobrado en los últimos años los conocidos como *lípidos catiónicos gemini* (GCLs). Estos lípidos no son comerciales y están constituidos por dos (o más) cadenas hidrofóbicas y dos cabezas polares cargadas positivamente con un grupo espaciador que las conecta (ver Figura 2.15 a modo de ejemplo). Una de las ventajas que presenta este tipo de lípidos es que, no sólo es posible realizar modificaciones estructurales en las cabezas polares y las colas hidrofóbicas, sino que también se puede modificar la naturaleza del espaciador. Hasta ahora, se han llevado a cabo varios estudios con diferentes tipos de espaciadores, encontrando que, en efecto, el espaciador interviene de forma importante en el proceso de compactación y liberación del DNA. Los resultados obtenidos muestran que, en general, GCLs con espaciadores flexibles, cortos, e hidrofílicos presentan mejores eficiencias de transfección que aquellos que tienen espaciadores rígidos, muy largos o



**Figura 2.14.** Estructuras de los distintos tipos de lípidos usados en terapia génica.

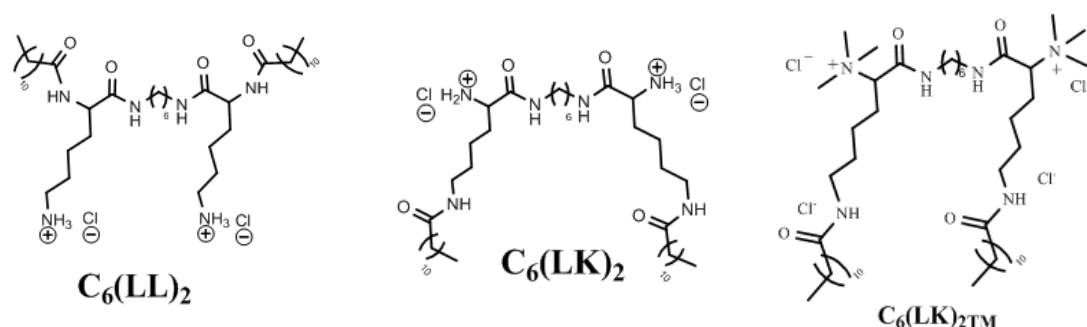
hidrofóbicos. Está documentado que los GCLs presentan, junto con los lípidos multivalentes (más de dos cargas positivas, MCLs, ver Figura 2.14), una mayor densidad de carga positiva por cadena que los lípidos catiónicos de doble cadena y una sola carga positiva (los habitualmente utilizados en la literatura y en las primeras etapas de esta línea de investigación). Debido a esta característica, se piensa que son más biocompatibles, puesto que para una misma densidad de carga positiva se tienen menos cadenas hidrofóbicas, que son las que confieren toxicidad a la molécula. Además, poseen la capacidad de formar nanoagregados que, por su similitud con las biomembranas, son compatibles con los sistemas biológicos. Factores estructurales, tales como el tipo de cabeza, el tipo y longitud del espaciador, y la longitud y grado de saturación de las cadenas hidrofóbicas son determinantes en la eficiencia transfectora del vector catiónico resultante. De hecho, se ha comprobado que, en la mayoría de los casos, los sistemas multivalentes son más eficientes que los monovalentes en la transfección. Conviene, por tanto, seguir probando con nuevas familias de GCLs, con distintas opciones para los elementos estructurales antes mencionados, con el fin de poder establecer una adecuada relación estructura-actividad (SAR, *structure-activity-relationship*) del vector escogido. La Figura 2.15 muestra algunos ejemplos de GCLs.



**Figura 2.15.** Ejemplos de GCLs.

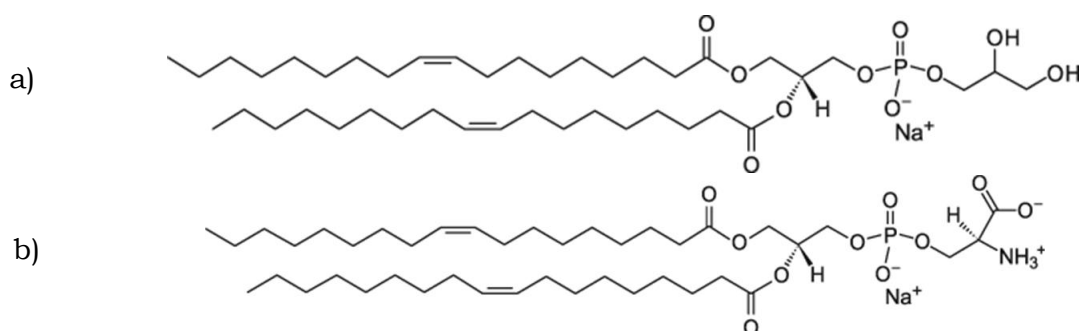
Otra familia de vectores génicos lipídicos biocompatibles, son los *lípidos derivados de aminoácidos*. En general, son lípidos catiónicos que incorporan en su estructura restos de aminoácidos que confieren al vector una menor toxicidad que los CLs convencionales; si, además, estos restos se incorporan en un esqueleto lipídico tipo gemini, se añade esta menor toxicidad a la ya conseguida y demostrada por el hecho de ser gemini. La Figura 2.16 muestra un ejemplo de este tipo de vectores, estudiado ya en nuestro grupo, el lípido catiónico gemini C<sub>6</sub>(LL)<sub>2</sub> sintetizado por nosotros,<sup>31</sup> que incorpora restos de lisina en su estructura. Como puede observarse, la estructura se caracteriza por tener dos C quirales en las cabezas catiónicas; se sabe que la quiralidad tiene especiales implicaciones, ya que da lugar a la formación de nanotubos, o cintas helicoidales (*helical-ribbons*) o cintas retorcidas (*twisted ribbons*) de bicapas o multicapas lipídicas. La figura muestra, además, otros posibles lípidos de esta categoría (todos de síntesis). Como puede observarse, son varios los factores que se pueden ir testando: tipo de resto incorporado (Lys, Arg), longitud del espaciador, longitud de las cadenas, tipo de unión del resto de aminoácido a la cadena ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), etc. En esta tesis se estudiará un compuesto tipo gemini con un resto de histidina.





**Figura 2.16.** Ejemplos de posibles GCLs con restos de aminoácidos.

Aunque la compactación del DNA por lípidos catiónicos es un fenómeno a estas alturas bien conocido y caracterizado, el mecanismo por el cuál se transfiere la información genética, la escasa eficiencia del proceso de transfección, la potencial toxicidad de lípidos catiónicos en un entorno celular, etc. son algunas de las preguntas cuyas respuestas no se conocen con exactitud todavía y/o escollos del fenómeno de *lipofección* que necesitan una solución. En éste último aspecto (toxicidad de los lípidos catiónicos), es reseñable el reciente uso de liposomas zwitteriónicos o aniónicos (ALs), de reconocida menor citotoxicidad) como alternativa en la compactación del DNA (ver Figura 2.17). Debido a que los liposomas aniónicos, ALs, están constituidos en su mayor parte por fosfolípidos que se encuentran naturalmente en las membranas celulares (fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina), son biocompatibles y seguros de usar. Además, la fagocitosis por macrófagos de los lipoplejos con potenciales de membrana negativos es menor que para sus análogos catiónicos; ello se debe a que la mayoría de las proteínas de reconocimiento celular en los medios biológicos están cargadas negativamente, por lo que las interacciones electrostáticas no son favorables.<sup>32</sup> Por ello, los ALs se han postulado en los últimos tiempos como sistemas potencialmente más seguros para vectorizar y transfectar material genético a las células. Su interacción con las membranas celulares, cargadas también negativamente, debe ser necesariamente mediada por cationes, esencialmente divalentes, que hacen las veces de puentes catiónicos efectivos. Se han probado distintos cationes divalentes, tales como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , y  $Zn^{2+}$ ;<sup>33,34</sup> entre ellos, el que ha mostrado mayor eficiencia, no sólo como mediador en la compactación del DNA, sino también como promotor de la internalización del lipoplejo por parte de las células, es el  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, los resultados de transfección obtenidos hasta el momento con este tipo de sistemas no han logrado superar, por el momento, los valores encontrados en algunos sistemas catiónicos<sup>31,35</sup>



**Figura 2.17.** Ejemplos de lípidos aniónicos, ALs: (a) DOPG (sal sódica de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol)) y (b) DOPS (sal sódica de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina).

Es reseñable que, independientemente del tipo de lípido usado, CLs o ALs, siempre van acompañados de lípidos coadyuvantes, por lo que el sistema global es un liposoma mixto. Estos lípidos coadyuvantes son normalmente lípidos zwitteriónicos que se caracterizan por presentar carga positiva y negativa en la misma molécula, siendo, por tanto, el pH del medio el que determina la carga neta global. Habitualmente, se utilizan mezclados en distintas proporciones con el lípido catiónico o aniónico a un pH tal que su carga neta sea nula. Se les considera imprescindibles en la transfección ya que, debido a la presencia de insaturaciones en sus cadenas (ver Figura 4.4 del capítulo experimental), disminuyen la temperatura de transición gel-fluido,  $T_m$ , de las bicapas lipídicas, fluidificándolas y favoreciendo así la fusión con la membrana celular (carácter fusogénico). Dependiendo de su parámetro de empaquetamiento,  $P$ , inducen la formación de distintas mesofases de cristal líquido (normalmente, fases lamelares  $L_\alpha$  o fases hexagonales inversas  $H_{II}$ ), que serán comentadas en detalle en un próximo apartado de esta Memoria. Se ha demostrado que las fases hexagonales favorecen un aumento en la eficiencia de la transfección celular. Dos ejemplos de este tipo de fosfolípidos zwitteriónicos: el DOPE (de la familia de las fosfatidiletanolaminas), inductor de fases hexagonales, y el DOPC (de la familia de las fosfatidilcolinas), inductor de las fases lamelares. El más utilizado y reconocido en la literatura como lípido coadyuvante por excelencia es el DOPE.

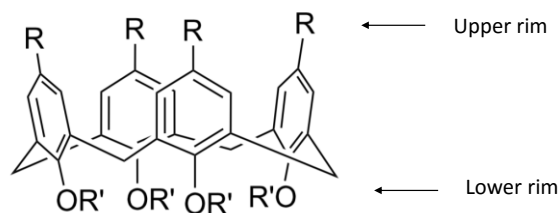
Por su parte, los lípidos neutros se caracterizan por no aportar carga al sistema. Al igual que los zwitteriónicos, se utilizan para formar liposomas mixtos con los lípidos catiónicos. Uno de los más utilizados, fundamentalmente en estudios de silenciamiento génico con siRNAs, es el monoleoil glicerol, comúnmente conocido como oleína o MOG, perteneciente a la familia de los glicerol. Su característica más interesante es que induce, para determinadas proporciones, la aparición de fases cúbicas de cristal líquido que, se cree, potencian la transfección celular aún más que las fases hexagonales.

En cualquiera de los casos, la biocompatibilidad característica de los liposomas, así como su biodegradabilidad y el bajo efecto inmunológico en el organismo, confiere a estos sistemas coloidales un elevado potencial como vectores terapéuticos.

### 2.3.2. Vectores macrocíclicos con matriz lipídica.

Otro enfoque diferente se basa en trabajar con moléculas que contengan macrociclos supramoleculares en su estructura; de ahí el nombre de estos vectores. Ciertamente, este tipo de compuestos incorporan también en su molécula cadenas hidrofóbicas de mayor o menor longitud, por lo que, a la postre, se espera que se auto-organicen con esquemas análogos a los vectores lipídicos antes mencionados. Dentro de este apartado específico, destacan los vectores tipo calixareno (CXs), tipo pilarareno (PLs) y las ciclodextrinas anfífilas policatiónicas (paCDs). Hay una característica común a todos estos vectores que los diferencia de los anteriores; frente a la naturaleza esencialmente polidispersa de los vectores anteriores, los que se presentan en este apartado se caracterizan por presentar estructuras bien definidas y controlables. Precisamente, el control de la arquitectura multifuncional de estas macromoléculas se revela como un factor determinante en el diseño de nuevos vectores génicos no virales. Propiedades como uniformidad, monodispersidad y multivalencia son, hoy en día, el foco de atención de todo el que trabaja en el área de diseño y síntesis de este tipo de vectores. A este respecto, el uso de andamios (esqueletos) macrocíclicos preorganizados, como lo presentados en este apartado, para conseguir reunir estratégicamente estas características señaladas, representa una interesante alternativa.

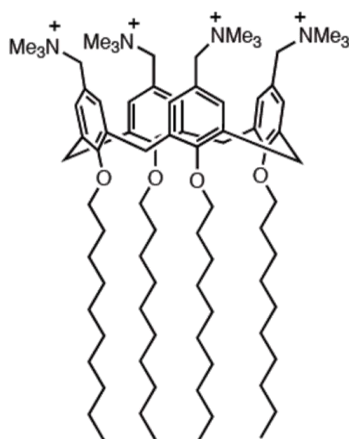
Los calixarenos (CXs) son compuestos que están despertando gran interés en su utilización como vectores de transfección en la terapia génica debido a sus características. Son macrociclos basados en un producto de hidroalquilación entre un fenol y un aldehído. La palabra calixareno deriva de la palabra “cáliz” ya que es la forma estructural a la que se asemeja esta molécula (Figura 2.18). Pueden presentar diferentes grupos funcionales tanto en los bordes superiores como inferiores del macrociclo, lo que permite que sean sistemas muy versátiles y con un amplio intervalo de opciones de preparación y funcionalización.



**Figura 2.18.** Estructura base de un calixareno, CX.

Cuando la funcionalización consiste en «colgar» cadenas hidrofóbicas, más o menos largas, en uno de los bordes y cabezas cargadas positivamente en el otro, el CX (Figura 2.19) presentará características parcialmente similares a los lípidos catiónicos multivalentes, mencionados en el apartado anterior. Así, al igual que los lípidos, los calixarenos pueden ser moléculas anfífilas, lo que les permite generar agregados coloidales en disolución. Tanto la capacidad de formar estructuras supramoleculares, como la posibilidad de tener cabezas polares cargadas positivamente en uno de los bordes les hacen candidatos adecuados para la compactación de DNA.

A partir de los trabajos del grupo de Aoyama sobre la interacción de los calixarenos con DNA, se han llevado a cabo una serie de estudios basados en calixarenos como vectores de transfección.<sup>36-40</sup> A nivel

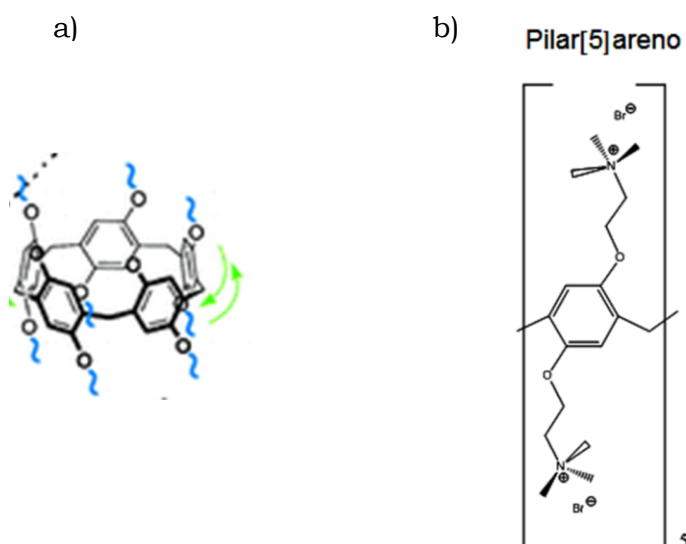


**Figura 2.19.** CX con matriz lipídica

estructural, se ha visto que las mejores eficiencias de transfección se obtienen con calixarenos que presentan cadenas de 6 a 8 átomos de carbono en el borde inferior y cabezas de guanidinio en el borde superior. Por otra parte, el uso del lípido coadyuvante DOPE también proporciona, en este caso, una mejora sustancial de los niveles de transfección. Los calixarenos, CXs, además, presentan niveles moderados de citotoxicidad celular, muy similares a los resultados que se obtienen con los lípidos catiónicos, CLs. Cabe destacar que se han obtenido resultados muy prometedores en líneas celulares de interés médico que

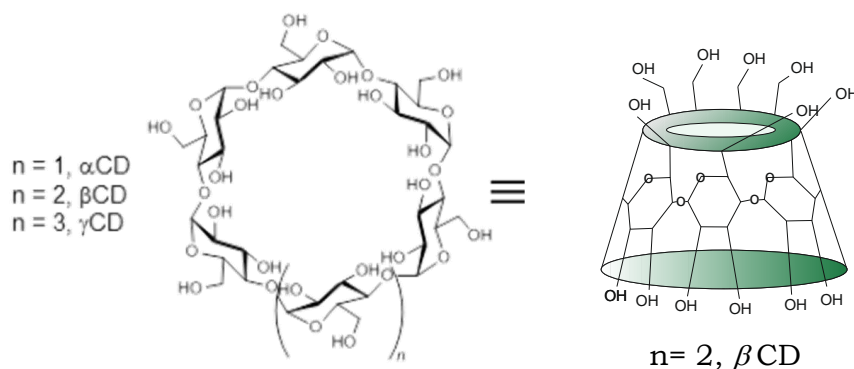
presentan serias dificultades para ser transfectadas con los métodos habituales, tal es el caso de los resultados obtenidos por el grupo de Ungaro para células RD-4. Sin embargo, aún faltan muchas cuestiones por explorar, ya que, a pesar de que los primeros trabajos se realizaron hace poco más de 10 años, la cantidad de investigaciones sobre el tema sigue siendo muy reducida.

Los pilararenos (PLs) son un tipo de macrociclos recientemente sintetizados. Están formados por subunidades de hidroquinonas unidas por metilenos en sus posiciones 2 y 5 (Figura 2.20a). A diferencia de otros macrociclos que presentan forma de cono, los pilararenos adoptan una forma tubular. Actualmente, estos compuestos se están usando en diferentes aplicaciones tanto a nivel químico como a nivel biológico. Un estudio reciente, ha demostrado la capacidad de los pilararenos para compactar y transfectar el plásmido pCMV-Luc en células HeLa. Aunque no están muy claras las propiedades que pueden presentar estos compuestos a nivel biológico, es una nueva línea de vectores supramoleculares con gran potencial. De hecho, nuestro grupo acaba de publicar un trabajo<sup>41</sup> en el que se utiliza el pilarareno policationico ( $P^{10+}$ ) mostrado en la Figura 2.20b como especie policationica mediadora en la interacción electrostática entre lípidos aniónicos y plásmidos DNA, ambos con cargas negativas. En contraposición con los cationes  $Ca^{2+}$  incapaces de invertir la carga del lipoplejo, el catión multivalente  $P^{10+}$  induce dicha inversión con éxito y favorece una transfección eficaz y biocompatible del plásmido pEGFP-C3.<sup>36</sup>



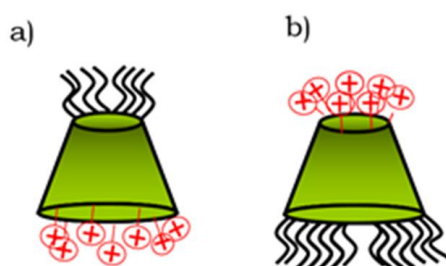
**Figura 2.20.** (a) Estructura molecular base de un pilarareno, PL; y (b) Ejemplo de PL con matriz lipídica.

Por su parte, los oligosacáridos cíclicos constituyen plataformas de anclaje muy convenientes para nuestros objetivos. En particular, las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos naturales provenientes de la degradación enzimática del almidón. Están constituidas por unidades de  $\alpha$ -D-Glucopiranosas unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ , con un impedimento de rotación en torno a los enlaces glicosídicos, que justifica la forma troncocónica de estos macrociclos. Presentan una cavidad ligeramente apolar (los protones H5 y H3 de cada anillo están orientados hacia el interior de la cavidad), unos bordes de cierta hidrofiliidad (los grupos  $-OH$  flanquean la entrada superior e inferior de la cavidad) y con una clara afinidad para encapsular moléculas hidrofóbicas en medios polares, lo que les proporciona un papel protagonista en el área de la farmacología, donde han sido profusamente utilizados como contenedores nanométricos o vectores de fármacos para aumentar su biodisponibilidad (ver Figura 2.21). Además de esta interesante propiedad, presentan otras dos adicionales que les convierten en potenciales vectores de transfección celular muy adecuados: i) su conocida capacidad para potenciar el proceso de absorción en las membranas celulares; y ii) su habilidad para estabilizar biomoléculas en medios fisiológicos, protegiéndolas de interacciones no específicas con potenciales agentes enzimáticos degradantes. De hecho, es conocida desde hace tiempo que su presencia en formulaciones con lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, o incluso con vectores víricos, mejora considerablemente los niveles de transfección; se ha justificado esta evidencia por la capacidad de las CDs para eliminar colesterol de las membranas biológicas.



**Figura 2.21.** Estructuras de las CDs madre.

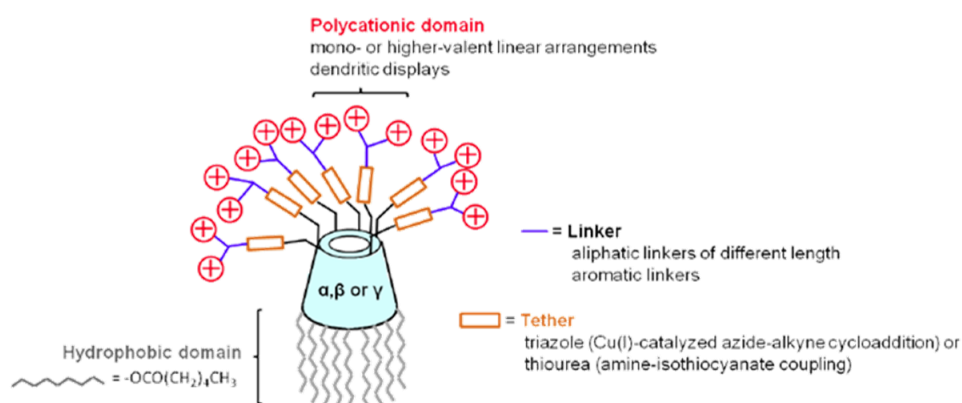
Sin embargo, el verdadero potencial de las CDs en terapia génica surge de la posibilidad de ser selectivamente funcionalizadas. De hecho, se han sintetizado en los últimos años una serie importante de vectores biocompatibles basados en CDs, en los que sus capacidades como agentes de transfección han sido moduladas de acuerdo a un plan previamente diseñado. Son destacables las CDs poliméricas, CDs dendriméricas, las CDs tipo estrella, los pseudo- y polirotaxanos basados en CDs (poliCDRx), las ciclodextrinas anfifílicas policationicas (paCDs) y las ciclotrehalinas (CTx). Entre todas estas posibilidades, esta Tesis Doctoral se ha centrado en el uso y caracterización de las paCDs como vectores de plásmidos de DNA. Estos compuestos combinan propiedades tales como biocompatibilidad, disponibilidad y un esqueleto estructural con simetría tubular con dos caras bien diferenciadas, susceptibles de ser selectivamente modificadas con el objetivo de conseguir un exquisito control de la naturaleza y orientación de las entidades incorporadas. Esta *anfifilicidad facial*, es decir, el hecho de presentar dos caras con características diferentes y funcionalizables, es una característica muy interesante para nuestros objetivos. De hecho, las paCDs surgen de la incorporación secuencial y controlada de diferentes entidades tipo policationico en uno de los dos anillos, y de tipo lipídico en el otro anillo de la estructura de cono truncado característica de las CDs. El vector resultante tenderá a autoagregarse en medios polares como el fisiológico y presentará, en principio, buenas aptitudes para biomimetizarse con la membrana celular y atravesarla, dos características muy adecuadas para poder ser un buen vector génico. La Figura 2.22 muestra un esquema de las estructuras flexibles resultantes en uno u otro caso (cargas positivas en el anillo primario o en el secundario), con nombres indicativos de su aspecto estructural o arquitectura: paCDs tipo medusa (jelly-fish type) o paCDs tipo falda (skirt type).



**Figura 2.22.** Estructuras tipo de paCDS. a) jellyfish-shaped paCD y b) skirt-shaped paCD.

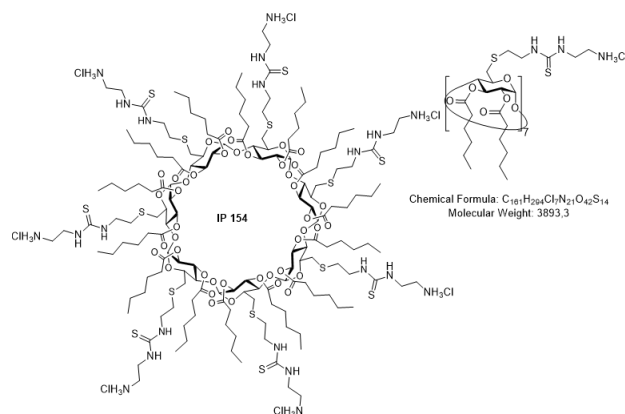
Son, por tanto, vectores multivalentes (varias cargas positivas), que aúnan las capacidades de los conocidos lípidos catiónicos, por un lado, y de los polímeros catiónicos, por otro. Los complejos que forman con los plásmidos de DNA, conocidos como *CDplejos*, son, por tanto, en parte *lipoplejos* y en parte *poliplexos*. Es de esperar, por tanto, que estos *CDplejos* serán transfectados al interior celular, es decir, atravesarán la membrana celular y liberarán el ácido nucleico en el interior, por mecanismos similares a los descritos ya para *poliplexos* y *lipoplejos*.

La mayor o menor eficacia de su capacidad como vectores en la transfección y silenciamiento está altamente relacionado con la estructura; es decir, factores como la flexibilidad de los conectores (*linkers*), tipo y longitud de espaciadores (*tethers*) y la presencia o ausencia de grupos promotores de enlaces de hidrógeno, tienen un claro efecto en el éxito final del vector (ver Figura 2.23). Respecto a este último punto, se ha estudiado la incorporación de grupos tiourea para la formación de enlaces de hidrógeno con el DNA.<sup>42</sup> También los grupos amino junto con los tiourea, pueden actuar de manera cooperativa con los grupos fosfato del pDNA a través de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno.<sup>43</sup> El grupo triazol también pueden actuar como un aceptor de enlaces de hidrógeno así como de regulador del pH endosomal favoreciendo la entrada en la célula al afectar a la estabilidad y por tanto, mejorando la liberación endosomal.<sup>44,45</sup>



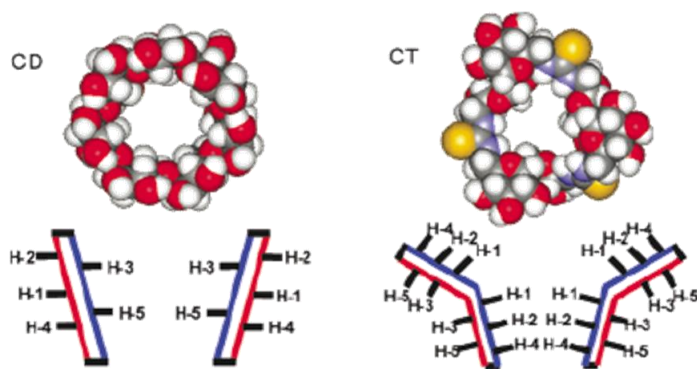
**Figura 2.23.** Esquema de paCD tipo, con información acerca de todos los elementos estructurales modificables.

Aunque existen en la literatura varias publicaciones que muestran la capacidad de estos compuestos para compactar pDNA y transfectarlo eficientemente *in vitro* e incluso *in vivo* <sup>46-49</sup>, hay por el momento muy pocos estudios publicados que intenten correlacionar sus características fisicoquímicas, esencialmente su estructura, con su actividad como vectores génicos. Por ello, una de las líneas que abre esta Tesis Doctoral se centra, precisamente, en la caracterización biofísica y evaluación bioquímica de una serie de *CDplejos*, como se detallará en un apartado próximo de esta Memoria. Para ello, se han utilizado diferentes paCDs con estructura tipo falda y combinaciones diferentes de grupos tiourea para, una vez obtenidos los resultados de transfección, poder establecer una adecuada relación estructura-actividad (SAR). La Figura 2.24 muestra un ejemplo de paCD con estructura del tipo “falda”.



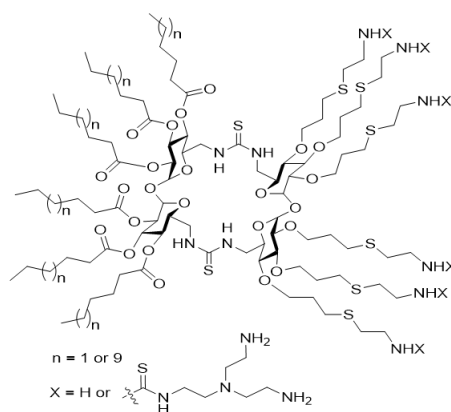
**Figura 2.24.** paCD tipo “falda” con matriz lipídica.

Por otra parte, las ciclotrehalanas (CTs) representan una peculiar familia de ciclodextrinas invertidas, con una estructura que se caracteriza porque la unidad básica de disacárido de maltosa con uniones  $\alpha$  (1-4) se reemplaza por una bloques de  $\alpha$  -  $\alpha'$ -trehalosa. El macrociclo resultante mantiene la forma troncocónica y la cavidad apolar características de las CDs. Asimismo, también muestra la anfifilicidad facial que tan adecuada resulta en el diseño de vectores génicos, como se acaba de comentar en el apartado anterior. La Figura 2.25 muestra una comparativa de ambos macrociclos antes de ser funcionalizados, es decir, muestra una CD y una CT, y la Figura 2.26 muestra un ejemplo del tipo de vectores basados en CTs. Recientemente, hemos publicado un trabajo en colaboración con varios grupos de investigación<sup>50</sup> en el que se utiliza una CT similar a la mostrada en la Figura 26 para transfectar con éxito células COS-7 y HepG2 *in vitro*, y posteriormente en ensayos con ratones *in vivo*.



**Figura 2.25.** Comparación de estructuras cíclicas CD vs CT.





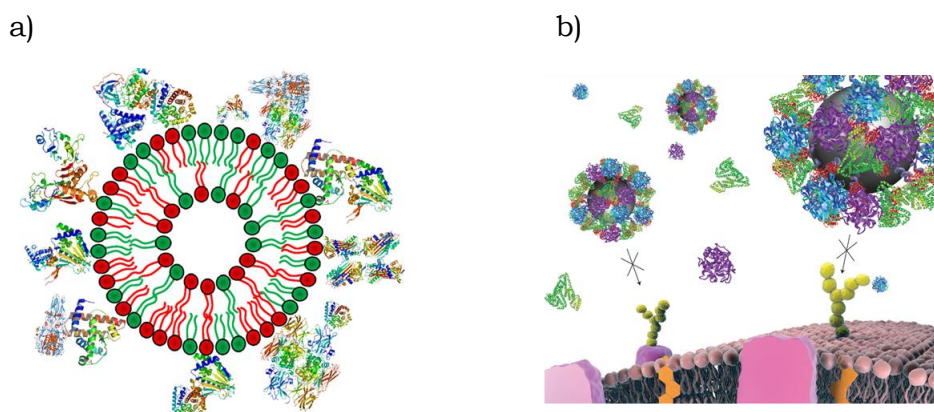
**Figura 2.26.** Ejemplo de CT con matriz lipídica.

## 2.4 Interacción del complejo vector-ácido nucleico con los fluidos biológicos.

Si hay algo que los investigadores de este campo tienen claro, tras más de una década de esfuerzos por desarrollar vectores génicos no virales, cada vez más eficaces en la transfección y menos citotóxicos para las células, es que una mejora definitiva de la eficacia terapéutica de estos agentes y su implementación en protocolos de transfección génica *in vivo*, pasa por un profundo y detallado entendimiento de las barreras extra e intracelulares del ácido nucleico transportado, sea DNA o siRNA. En otras palabras, establecer adecuadas relaciones entre los aspectos estructurales y arquitectónicos del vector génico, cruciales en su diseño, síntesis, y posterior capacidad de compactación del DNA o siRNA, y sus prestaciones finales en la transfección celular (lo que se conoce habitualmente como SAR, i.e. relación estructura-actividad biológica) es sólo la punta de iceberg de una compleja problemática que todavía hoy estamos lejos de conocer y controlar en profundidad. Entender cómo afectan los mecanismos de internalización celular y de salida del endosoma formado, así como el tráfico intracelular, en el proceso de transfección es un prerequisite indispensable para mejorar su eficiencia.

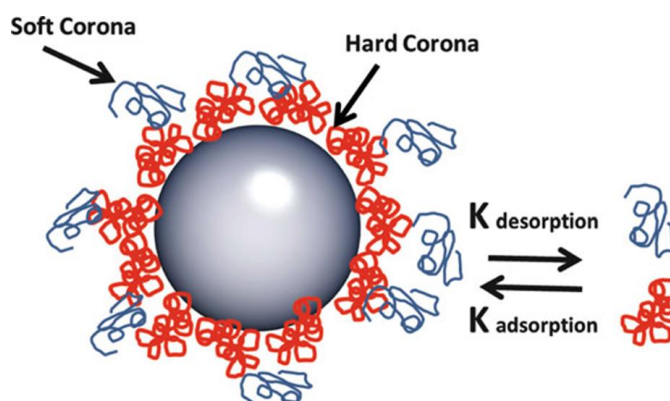
A este respecto, existe un área de investigación con una actividad creciente en los últimos años: el estudio de la interacción del vector génico con los fluidos biológicos y el efecto que esta interacción pueda tener en el proceso de captación y transfección celular.

Se sabe que cuando un vector terapéutico (liposoma, nanopartícula, polímero, macrociclo) entra en contacto con el plasma sanguíneo o cualquier otro fluido biológico que contenga proteínas, su superficie se “decora” inmediatamente con distintas proteínas que forman una corona biológicamente activa conocida como *protein corona* (o *corona de proteínas*). La Figura 2.27 muestra un dibujo de la corona proteica sobre la superficie de un liposoma mixto (a) y sobre la superficie de una nanopartícula, NP (b).



**Figura 2.27.** Corona de proteínas (protein corona) sobre la superficie de: (a) un liposoma mixto; y (b) nanopartícula.

Tras una administración intravenosa, la sangre es el primer entorno fisiológico que "ve" el nanovector. El plasma sanguíneo contiene varios miles de proteínas diferentes, con diferencias en concentración de más de 12 órdenes de magnitud, por lo que la mayoría de las biomoléculas adsorbidas en la superficie de los nanovectores son proteínas plasmáticas, aunque también se han reportado algunos lípidos. Por lo tanto, existe una competencia entre diferentes moléculas biológicas por adsorberse en la superficie de las nanopartículas o nanovectores. En una etapa inicial, son las proteínas más abundantes las que se adsorben primero, pero con el tiempo, serán reemplazados por proteínas de mayor afinidad (efecto de Vroman). Se distinguen dos regiones en la corona proteica: 1) la que se conoce como corona dura (*hard corona*), constituida por proteínas adsorbidas fuertemente sobre la superficie del nanovector mediante interacciones nanovector-proteína, y que son difícilmente desorbibles, y 2) la denominada corona suave (*soft corona*), constituida por proteínas que interaccionan débilmente con las proteínas de la primera capa mediante interacciones proteína-proteína débiles, pero que muestran afinidades bajas por la superficie del nanovector. Evidentemente, el proceso de adsorción-desorción es un proceso dinámico, de tal manera que la composición de la corona va cambiando con el tiempo hasta que alcanza una composición de equilibrio en un tiempo promedio de unas cuantas horas. De hecho, la corona dura se caracteriza por tiempos de intercambio muchos más largos (del orden de horas) que la corona suave. La Figura 2.28 muestra un esquema ilustrativo al respecto.

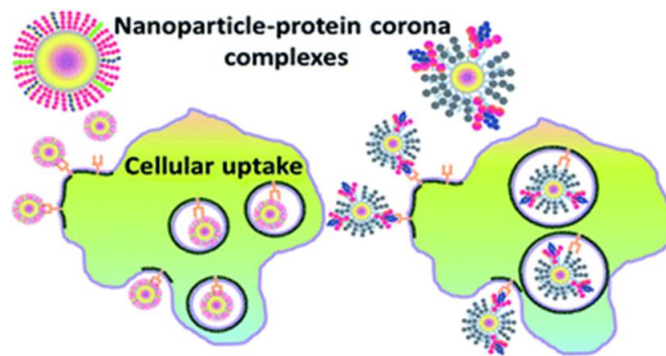


**Figura 2.28.** Ilustración esquemática de la corona proteica dura y la corona proteica suave sobre una nanopartícula. Asimismo, se muestra el concepto de adsorción y

desorción de tales proteínas. Nótese que ambas regiones están compuestas en el esquema por un sólo tipo de proteínas, por simplicidad del dibujo. La realidad biológica es mucho más compleja.

La corona proteica altera el tamaño y la superficie e interfase del nanovector, originando una nueva entidad biológica, el complejo vector/DNA + su corona proteica, que es la que realmente ven las células. Consecuentemente, esta nueva entidad y sus características influyen en gran medida en la respuesta fisiológica celular, y, por consiguiente, en la eficiencia del proceso de transfección. Es importante tener en cuenta, además, que la corona proteica no es universal, es decir, su composición no es única para cada nanovector y depende de un buen número de parámetros. Además, la proporción relativa de las distintas proteínas en la corona no se correlaciona con sus abundancias relativas en el plasma.

La naturaleza dinámica y la huella dactilar de esta corona proteica tiene un marcado efecto no sólo en la capacidad del vector para compactar el ácido nucleico, sino en su farmacodinámica, es decir en su cinética de liberación, su capacidad para alcanzar la diana celular y su estabilidad dentro del torrente sanguíneo (i.e. tiempo de vida del nanovector en el torrente sanguíneo), así como en los procesos de aglomeración y captación celular, la señalización, el transporte, la acumulación y la toxicidad (ver Figura 2.29).



**Figura 2.29.** Captación celular de la entidad nanovector-pDNA-corona proteica.

Es interesante resaltar que las consecuencias biológicas de la existencia de la corona proteica pueden ser tanto beneficiosas como perjudiciales para las aplicaciones biomédicas de los vectores genéticos no virales. Así, por un lado puede favorecer que el vector terapéutico alcance su diana celular, potenciar su captación (“uptake”), y disminuir su citotoxicidad, pero, por otra parte, también puede provocar una rápida eliminación del vector del torrente sanguíneo o, incluso, reacciones inflamatorias. Se sabe, por ejemplo, que la adsorción de diopsoninas como HSA (*human serum albumina*), apolipoproteínas, etc pueden prolongar la presencia del nanovector en el torrente sanguíneo. De hecho, existen prometedores resultados que evidencian que la participación de las diopsoninas en la corona proteica del nanovector proporcionan al nanovector una señal de “no me comas” a los macrófagos existentes.

Por consiguiente, conocer con detalle la estructura y morfología del vector es fundamental para entender su papel en terapia génica, pero no lo es menos tener información del perfil de proteínas que se adsorben sobre su superficie y/o sobre la del complejo que forma con el DNA, y de cómo este perfil cambia con el tiempo y con la confluencia de todos los factores que afectan y que se va a analizar

brevemente a continuación. En otras palabras, resulta imprescindible conocer el perfil proteómico de la corona para predecir sus efectos biológicos y para ajustar las características fisicoquímicas del vector a su pretendida actividad biológica. Precisamente, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral se centra en completar la caracterización biofísica de algunos de los nanovectores utilizados con una adecuada caracterización de su corona proteica para, con toda la información obtenida de ambas caracterizaciones, comprender mejor el proceso de transfección celular.

Para llevar a cabo tal caracterización, hay que tener en cuenta que la estructura y composición de la corona de proteínas depende de una serie de factores, entre los que destacan: i) las propiedades fisicoquímicas del nanovector (tipo, tamaño, forma, curvatura, composición, funcionalidad de los grupos que están en la superficie, balance hidrofóbico/hidrofílico, y la densidad de carga superficial), ii) la naturaleza del entorno fisiológico (sangre, líquido intersticial, citoplasma de la célula, etc), iii) la duración de la exposición (o tiempo de incubación) y iv) temperatura

### i) Propiedades Fisicoquímicas del Nanovector

Se ha encontrado que el tipo de nanovector, NP, liposoma, polímero, etc, influye en el patrón de adsorción de las proteínas plasmáticas. Su carga superficial es uno de los factores más decisivos para el tipo de proteínas que tendrán tendencia a adsorberse y a la afinidad de la interacción. Así, parece que la adsorción aumenta con la carga superficial. Los vectores con carga neta positiva (liposomas catiónicos, por ejemplo), es decir, los utilizados en nuestro grupo de investigación, adsorben preferentemente proteínas con puntos isoeléctricos (pI) inferiores a 5,5, como la albúmina, mientras que superficies cargadas negativamente (liposomas aniónicos, por ejemplo) tendrían preferencia por proteínas con  $pI > 5,5$ , como por ejemplo IgG. También se ha reportado que las superficies cargadas pueden inducir la desnaturalización de la proteína, mientras que las superficies neutras preservan la estructura natural proteica. Por otra parte, se puede funcionalizar la superficie del nanovector y/o pre-recubrirla adecuadamente para disminuir la adsorción de proteínas o controlar la composición de la corona. Entre los compuestos utilizados a tal efecto destacan: PEG, dextrano, Pluronic F127, polisorbato y polioxietileno. En cualquier caso, el papel exacto de estos recubrimientos en la corona proteica se desconoce, por lo que son necesarios más estudios al respecto. La hidrofobicidad de la superficie es otro factor a considerar, ya que tiene también un marcado efecto en la cantidad y composición de proteínas adsorbidas. Parece que superficies hidrofóbicas y cargadas tienden a adsorber más proteínas que las superficies neutras e hidrofílicas, pero las desnaturalizan.

Las afinidades de las proteínas por la superficie del nanovector, así como el tipo de proteína adsorbida (es decir, la composición de la corona proteica) también están afectadas por tamaño y curvatura del nanovector. De ningún modo se pueden extrapolar datos de adsorción de proteínas en superficies planas a lo que ocurre en las superficies curvas de los nanovectores empleados. Así, las proteínas adsorbidas sobre superficies altamente curvadas suelen sufrir menos cambios conformacionales que si la superficie está poco curvada. Por otra parte, los efectos

de tamaño son particularmente importantes cuando el tamaño del nanovector se aproxima al de la proteína.

### ii) Naturaleza del Entorno Fisiológico

Distintos estudios publicados en la literatura ponen de manifiesto que la interacción entre las proteínas del plasma y la superficie del nanovector, y, en consecuencia, la respuesta celular están influenciados por el medio en el que vector y proteínas se encuentren, y este medio es diferente en estudios *in vitro* y estudios *in vivo*.

En experimentos *in vitro*, se ha encontrado que la composición de la corona proteica y su dinámica de adsorción-desorción cambia en función de los medios utilizados, habitualmente DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) y FBS (Fetal Bovine Serum). Estos medios difieren mucho en cuanto a su composición en aminoácidos, glucosa y sales. Por tanto, es importante conocer el efecto del medio en la corona proteica del nanovector, previo a la realización de los ensayos de transfección celular y de citotoxicidad.

En situaciones *in vivo*, también existe un marcado efecto del tipo de fluido fisiológico de que se trate, ya que la composición de proteínas y su concentración no es la misma dependiendo de si se trata de fluido subcutáneo, intramuscular, intraóseo, intradérmico, intravenoso, intralumbar, etc. Es más, en el “viaje” que el nanovector experimente una vez dentro del organismo, puede enfrentarse a más de un tipo de fluido biológico. Este factor, sin embargo, está poco estudiado en la literatura.

En ambos casos, también es importante considerar la variable concentración, ya que se sabe que el espesor de la corona proteica aumenta con la concentración de proteínas en plasma. Ello implica ineludiblemente que la corona proteica puede cambiar significativamente de los ensayos *in vitro* a los estudios *in vivo*, ya que siempre es menor la concentración en proteínas del medio en los primeros. Ello nos lleva a una conclusión no deseada, pero real: los ensayos *in vitro* nunca pueden predecir al 100% el comportamiento de nuestros vectores génicos en entornos biológicos vivos.

### iii) Duración de la Exposición (o tiempo de incubación)

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la corona proteica es dinámica, es decir, las proteínas que la constituyen se adsorben y desorben con tiempos de intercambio característicos de cada proteína para cada nanovector. Así, las proteínas de la corona dura se caracterizan por tiempos de intercambio altos (del orden de horas), suficiente para muchos fenómenos fisiológicos, mientras que las de la corona suave tienen tiempos de intercambio más cortos. Es decir, la competición de más de 3700 proteínas del plasma sanguíneo por un sitio en la corona provoca un continuo cambio o evolución en la misma, que la convierte en una capa dinámica, de composición cambiante. En la mayor parte de los casos, en un primer estadio se adsorben las proteínas más abundantes en el plasma, para ser reemplazadas con el tiempo por aquellas con mayores afinidades por la superficie del nanovector. Esta evolución temporal de la composición de la corona proteica, como resultado de una solución de compromiso entre abundancia de las proteínas en el plasma, velocidades de adsorción/desorción, tiempos de

residencia y afinidades por la superficie del nanovector, es lo que se conoce como efecto Vroman. En el tipo de nanovectores estudiados en este proyecto, habitualmente, la albúmina, IgG y fibrinógeno son las proteínas que se adsorben en un primer estadio, para ser reemplazadas posteriormente por apolipoproteínas y factores de coagulación.

Dado el carácter dinámico de la corona proteica, hay una variable importante a tener en cuenta en todo experimento de este tipo: el tiempo de exposición o incubación, es decir, el tiempo en que las muestras de lipoplejos o poliplexos o CDplejos o NPplejos están en contacto o incubándose con suero sanguíneo humano. La mayoría de los estudios cinéticos concluyen que el tiempo de incubación, efectivamente, tiene una marcada influencia en el tipo y cantidad de proteínas adsorbidas, y que normalmente se alcanza una composición final de equilibrio después de un determinado número de horas que conviene conocer. Por ello, se debe llevar a cabo una caracterización de la corona proteica a varios tiempos de incubación. Es interesante remarcar que los tiempos cortos modelizan muy bien las interacciones nanovector-plasma sanguíneo cuando estos nanovectores son administrados localmente en tumores, mientras que tiempos de incubación y medida más largos podrían reproducir muy bien las interacciones experimentadas por los nanovectores en tratamientos sistémicos.

#### iv) Temperatura

La temperatura es uno de los factores más influyentes en la composición de la corona proteica, pero también uno de los menos estudiados. La temperatura media corporal está en el intervalo de 35 a 38 °C y debería ser uno de los factores a considerar en todos los ensayos *in vivo*, ya que es de esperar que, si la corona proteica se afecta, también lo hará el proceso de captación celular del nanovector con el ácido nucleico compactado.

Indudablemente, si se utiliza un medio láser para favorecer el proceso de liberación del ácido nucleico por parte del nanovector, se debe evaluar el efecto del aumento local de temperatura. Éste es, de hecho, un campo de investigación muy actual.

## 2.5 Bibliografía

- (1) Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P. *Science* **1995**, 270, 475.
- (2) Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.-L. *Science* **2000**, 288, 669.
- (3) Aiuti, A. *Best Pract. Res. Cl. Ha.* **2004**, 17, 505.
- (4) Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J. *J. Gene Med.* **2007**, 9, 833.
- (5) Selkirk, S. *Postgrad. Med. J.* **2004**, 80, 560.
- (6) Miller, A. D. *Blood* **1990**, 76, 271.
- (7) Klug, W. S.; Cummings, M. R. *Concepts of genetics*; Pearson Education, Inc, 2003.
- (8) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharm.* **2008**, 5, 505.
- (9) Patil, S. D.; Rhodes, D. G.; Burgess, D. J. *AAPS J.* **2004**, 6, E29.
- (10) Johnston, S. A.; Talaat, A. M.; McGuire, M. J. *Arch. Med. Res.* **2002**, 33, 325.
- (11) Vorburger, S. A.; Hunt, K. K. *The oncologist* **2002**, 7, 46.
- (12) Dorsett, Y.; Tuschl, T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 318.
- (13) Tadin-Strapps, M.; Peterson, L. B.; Cumiskey, A.-M.; Rosa, R. L.; Mendoza, V. H.; Castro-Perez, J.; Puig, O.; Zhang, L.; Strapps, W. R.; Yendluri, S. *Journal of lipid research* **2011**, 52, 1084.
- (14) Manczak, M.; Reddy, P. H. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* **2013**, 1832, 2368.
- (15) Wettig, S. D.; Verrall, R. E.; Foldvari, M. *Curr. Gene Ther.* **2008**, 8, 9.
- (16) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; Wiley & Sons: New York, 1980.
- (17) Zana, R. *Dynamics of Surfactant Self-Assamblies. Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*; CRC Press: Boca Raton, 2005.
- (18) Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1976**, 72, 1525.
- (19) Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*; Oxford Sci.: Oxford, 1995.
- (20) Jones, M. N.; Chapman, D. *Micelles, Monolayers and Biomembranes*; Wiley-Liss: New York, 1995.
- (21) Menger, F. M.; Zana, R.; Lindman, B. *J. Chem. Educ* **1998**, 75, 115.
- (22) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (23) Attwood, D.; Florence, A. T. *Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology*; Chapman and Hall: London, 1983.
- (24) Wennerström, H.; Evans, D. The colloidal domain: where physics, chemistry, biology, and technology meet; Wiley-VCH: New York, 1999.
- (25) Israelachvili, J. *Intermolecular and Surfaces Forces: with Applications to Colloidal and Biological Systems*; Academic Press: London, 1992.
- (26) Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 3020.
- (27) Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1974**, 78, 2469.
- (28) Fendler, J. H. *Membrane Mimetic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1982.
- (29) Barreleiro, P. C. A.; Olofsson, G.; Brown, W.; Edwards, K.; Bonassi, N. M.; Feitosa, E. *Langmuir* **2002**, 18, 1024.
- (30) Feitosa, E.; Alves, F. R.; Niemiec, A.; Oliveira, M. E. C. D. R.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, 22, 3579.

- (31) Barran-Berdon, A. L.; Muñoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Perez, L.; Infante, M. R.; Castro-Hartmann, P.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2012**, 8, 7368.
- (32) Roerdink, F.; Wassef, N. M.; Richardson, E. C.; Alving, C. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 734, 33.
- (33) Srinivasan, C.; Burgess, D. J. *J. Controlled Release* **2009**, 136, 62.
- (34) Liang, H.; Harries, D.; Wong, G. C. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 11173.
- (35) Nierengarten, I.; Nothisen, M.; Sigwalt, D.; Biellmann, T.; Holler, M.; Remy, J. S.; Nierengarten, J. F. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 17552.
- (36) Barran-Berdon, A. L.; Yelamos, B.; Garcia-Rio, L.; Domenech, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 14404.
- (37) Rodik, R. V.; Anthony, A. S.; Kalchenko, V. I.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. *New J. Chem.* **2015**, 39, 1654.
- (38) Bagnacani, V.; Franceschi, V.; Bassi, M.; Lomazzi, M.; Donofrio, G.; Sansone, F.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Nature Commun.* **2013**, 4.
- (39) Sansone, F.; Dudic, M.; Donofrio, G.; Rivetti, C.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cellai, S.; Ungaro, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14528.
- (40) Sansone, F.; Dudic, M.; Donofrio, G.; Rivetti, C.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cellai, S.; Ungaro, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14528.
- (41) Barran-Berdon, A. L. M.-N., M.; García-Río, L.; Domènech, O.; Tros de Ilarduya, C.; Aicart, E.; Junquera, E. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, DOI: 10.1039/C6TB02939F.
- (42) Jiménez Blanco, J. L.; Bootello, P.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5136.
- (43) Hirsch, A. K.; Fischer, F. R.; Diederich, F. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 338.
- (44) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J. J.; Jaffrès, P. A. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, 157, 166.
- (45) Srinivasachari, S.; Liu, Y.; Zhang, G.; Prevette, L.; Reineke, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8176.
- (46) Diaz-Moscoso, A.; Balbuena, P.; Gomez-Garcia, M.; Ortiz Mellet, C.; Benito, J. M.; Le Gourrierc, L.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Mazzaglia, A.; Micali, N.; Defaye, J.; García Fernandez, J. M. *Chem. Commun.* **2008**, 2001.
- (47) Aranda, C.; Urbiola, K.; Ardoy, A. M.; García Fernandez, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Tros de Ilarduya, C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 85, 390.
- (48) Bienvenu, C.; Martinez, A.; Blanco, J. L. J.; Di Giorgio, C.; Vierling, P.; Ortiz Mellet, C.; Defaye, J.; García Fernandez, J. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 5570.
- (49) Ortiz Mellet, C.; García Fernandez, J. M.; Benito, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1586.
- (50) Jiménez Blanco, J. L.; Ortega-Caballero, F.; Blanco-Fernández, L.; Carmona, T.; Marcelo, G.; Martínez-Negro, M.; Aicart, E.; Junquera, E.; Mendicuti, F.; Tros de Ilarduya, C.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 10117.



# **CAPÍTULO 3**

ASPECTOS  
METODOLÓGICOS

### 3.- ASPECTOS METODOLÓGICOS

---

El fenómeno de compactación del DNA y siRNA por nanoagregados lipídicos (línea de investigación principal del grupo, en la que se basa esta Tesis Doctoral) está ampliamente documentado en la bibliografía, tanto desde un punto de vista biofísico como desde el punto de vista bioquímico. En la caracterización biofísica destaca el uso de las más variadas técnicas experimentales de alta precisión (crio-TEM, TEM, *freeze-fracture*, espectroscopía de fluorescencia, FTIR, DLS, SAXS, potencial  $\zeta$ , conductimetría, tensión superficial, CFM, DSC, etc., por mencionar sólo las más representativas), así como los métodos de simulación por ordenador (*coarse graining*, DM, MC) y/o modelos semiempíricos y/o teóricos (modelo de agregación-desagregación o de condensación y condensación reentrante, teoría de la renormalización de cargas, etc.). Por otra parte, están publicados en la bibliografía numerosos estudios bioquímicos (FACS y microscopía confocal de fluorescencia) dirigidos a evaluar la eficiencia del vector coloidal en la transfección, es decir, su capacidad para compactar el DNA, transportarlo al interior celular (atravesando el torrente circulatorio sin ser degradado por las enzimas), y liberarlo en el citoplasma, para su posterior entrada y expresión en el núcleo celular, codificando un determinado gen de una proteína. Además, es necesario evaluar la citotoxicidad y la actividad inmune del vector y del lipoplejo (ensayos MTT), así como el comportamiento de las células y de los lipoplejos en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Las estrategias más novedosas incluyen, además, la evaluación del perfil proteómico (corona de proteínas) del vector y del complejo vector-ácido nucleico, cuando son incubados durante un cierto tiempo con fluidos biológicos. Esta información es crucial para posteriores ensayos *in vivo* y clínicos.

Sin embargo, a pesar de este esfuerzo por parte de químicos, físicos y biólogos, lo cierto es que son muchas las preguntas que quedan todavía por contestar en cuanto a la compactación de ácidos nucleicos (como agentes terapéuticos) por nanoestructuras coloidales. Y, por supuesto, sigue sin solucionarse el escollo más importante: aumentar su eficiencia en los procesos de transfección *in vivo*, para poder finalmente llegar al último objetivo, su uso como vectores terapéuticos de transfección génica en el tratamiento de múltiples enfermedades, sustituyendo, así, a los potencialmente peligrosos vectores víricos.

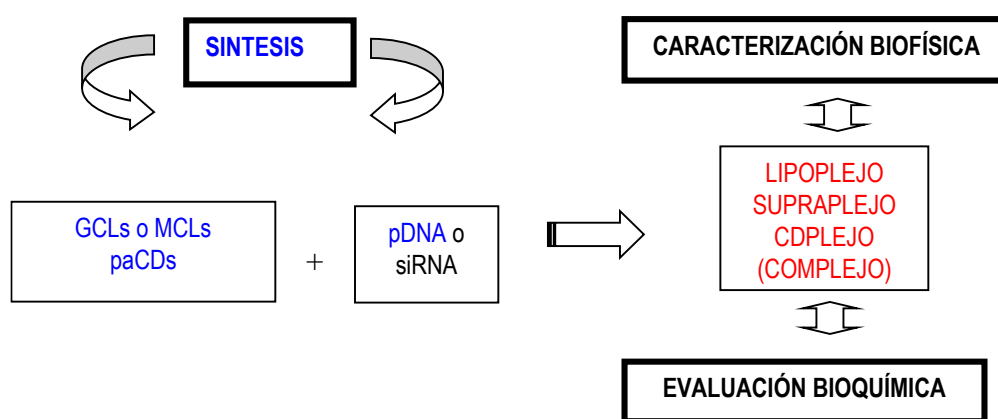
Probablemente, una de las causas de este aparente “cuello de botella” en esta investigación sea que ha habido cierta descoordinación entre las distintas disciplinas a la hora de abordar estos estudios: los químicos orgánicos se han encargado de sintetizar lípidos, pero no siempre con un plan prediseñado y un objetivo concreto; los químicos físicos han caracterizado los lipoplejos habitualmente en condiciones no fisiológicas y, desde luego, trabajando con DNAs comerciales lineales; y los bioquímicos han llevado a cabo sus ensayos

con plásmidos para los que no tenían información previa de cómo se comportaba el lipoplejo correspondiente y de cuáles eran sus parámetros característicos. El problema radica, por tanto, en que la mayor parte de los estudios publicados son independientes y unidisciplinarios; ciertamente, se encuentran en la bibliografía, sobre todo la de hace algunos años, muy pocos (comparativamente) estudios sistemáticos que aborden la problemática del fenómeno de transfección de material genético al interior celular con este triple planteamiento coordinado de:

- i) el diseño y la síntesis de vectores y/o de agentes terapéuticos, que permita poder trabajar no con DNAs, RNAs y vectores comerciales, sino con compuestos diseñados y sintetizados en el laboratorio con una estrategia preliminar clara;
- ii) la caracterización biofísica sistemática y rigurosa del sistema vector-pDNA o siRNA, que englobe información termodinámica, estructural y electroquímica, tanto experimental como teórica, en la medida de lo posible. Los plásmidos deben ser idénticos a los que los bioquímicos utilizan posteriormente en sus experimentos, y no DNA comerciales lineales, y
- iii) la evaluación bioquímica de la capacidad de los sistemas caracterizados para transfectar células, con la máxima eficiencia, conjugada con los mínimos niveles de citotoxicidad posibles, mejorando los resultados tanto de los estándares universalmente aceptados por la comunidad científica, como de los vectores ya reportados en la bibliografía.

Y es en este punto donde adquiere especial relevancia la aportación de la investigación llevada a cabo en este campo por el grupo al que pertenezco, y, en particular, de esta Tesis Doctoral, ya que abordamos el estudio de los lipoplejos (o supraplejos o CDplejos) con el triple enfoque antes mencionado. Así, trabajamos tanto con vectores comerciales y DNA lineal de doble hebra comercial, como con vectores biocompatibles de diseño (sintetizados, por tanto) y plásmidos de DNA, amplificados también en nuestro laboratorio; abordamos la caracterización biofísica de los complejos con diversas técnicas, desde un punto de vista electroquímico y estructural; y finalmente, analizamos la potencialidad de los compuestos sintetizados como vectores génicos de pDNA o siRNA mediante su inserción en células *in vitro* (eficiencia en la transfección y baja citotoxicidad). En esta Tesis Doctoral, además, se ha llevado a cabo una evaluación del perfil proteómico de algunos de los sistemas estudiados y su incidencia en las prestaciones del vector.

El siguiente esquema (Figura 3.1) resume los distintos bloques coordinados que integran la Tesis Doctoral presentada:



**Figura 3.1.** Esquema del planteamiento metodológico.

El planteamiento general de la Tesis es encontrar vectores no virales, bien de plásmidos o del siRNA (Objetivos 1 y 2), que sean capaces de mejorar las prestaciones de los actualmente existentes, y analizar su comportamiento en contacto con fluidos biológicos (Objetivo 3). En particular, se pretende diseñar un protocolo de trabajo que permita valorar si un determinado vector es potencialmente un sistema adecuado para transfectar material genético al interior de las células vivas. El protocolo debe:

- i) informar de si su eficiencia de transfección se conjuga con una baja citotoxicidad;
- ii) confirmar si mejora los resultados obtenidos por los estándares de transfección actuales;
- iii) verificar que su interacción con fluidos biológicos es favorable al proceso de transfección; y
- iv) permitir elegir entre una serie de vectores, cuáles serían los óptimos, relacionando esta conclusión con parámetros característicos del sistema (estructura, carga, etc.) que posibilite predecir las prestaciones de vectores similares.

Para poder alcanzar estos objetivos, se necesita, como se ha indicado anteriormente, llevar a cabo una rigurosa caracterización de los complejos que los vectores no virales propuestos en este proyecto forman con el biopolímero (DNA o siRNA), una caracterización que nos permita conocer:

-la carga superficial efectiva (no necesariamente igual a la nominal) del vector y del complejo para distintas proporciones, tanto de los constituyentes del vector (composición del vector), como de los integrantes del complejo, vector y biopolímero (composición del complejo). Esta información es crucial para saber qué complejos serían potencialmente adecuados en un ensayo de transfección, donde se necesita que la carga neta global sea positiva.

-qué grado de compactación ejerce el vector sobre el pDNA o siRNA.

-qué forma, tamaño, morfología, polidispersidad y estructura tienen los vectores en ausencia y presencia del biopolímero. Se sabe que existe una estrecha relación

entre el tipo de estructura y tamaño de los complejos y su capacidad para transfectar el pDNA o siRNA a las células.

-qué tipo de interacción tiene lugar entre el vector y el biopolímero.

-el grado de fluidez o flexibilidad de las bicapas lipídicas (en el caso de vectores lipídicos) en ausencia y presencia del pDNA o siRNA, muy relacionada también con la capacidad del liposoma como agente de transfección.

De nada nos sirve un complejo perfectamente caracterizado si, finalmente, no logra atravesar la membrana celular y liberar el pDNA o siRNA en el interior celular. Por ello, los complejos ya caracterizados deben superar una evaluación bioquímica, consistente en analizar *in vitro*, para distintas líneas celulares:

-su eficiencia en la transfección celular con diferentes líneas celulares.

-su citotoxicidad. Un vector génico muy eficaz transfectando células, pero muy citotóxico en un entorno celular, no aporta ningún avance en la investigación sobre nuevos protocolos de terapia génica.

-su perfil proteómico en contacto con fluidos biológicos.

Otro estudio complementario se centra en la evaluación de la capacidad del vector para proteger el ácido nucleico de la acción degradante de DNAsas, para lo que se recurre a estudios electroforéticos con geles de protección.

Por supuesto, estos resultados deben estar contrastados con los resultados obtenidos en las mismas condiciones para estándares de transfección universalmente aceptados. Existen en el mercado algunos como Lipofectamina (Life Technology), Escort (Sigma Aldrich) y Turbofect (Thermo scientific) usados de manera universal en ensayos *in vitro*.

Para abordar todos estos aspectos, he trabajado a lo largo de estos años, bien en nuestro laboratorio, en CAIs de investigación o en colaboración con otros grupos, con una serie de técnicas experimentales de precisión:

-Las cargas efectivas de vector y agente terapéutico se obtienen a partir de medidas de movilidad electroforética o potencial zeta, con una técnica electroquímica de precisión, técnica PALS, que, además, nos permite estimar tamaños de los nanoagregados formados.

-La capacidad del vector escogido para compactar el pDNA o siRNA se evalúa mediante experimentos de electroforesis en gel de agarosa.

-Las estructuras, morfologías y tamaños de los lipoplejos (o supraplejos o CDplejos) se determinan mediante crio-microscopía electrónica de transmisión (crio-TEM), complementada con medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) y/o con experimentos de SAXS.

-La fluidez de la membrana lipídica en ausencia y presencia de agente terapéutico (pDNA o siRNA) se estima mediante experimentos de anisotropía de fluorescencia.

Por otra parte, la caracterización bioquímica se ha basado en el uso de tres técnicas experimentales:

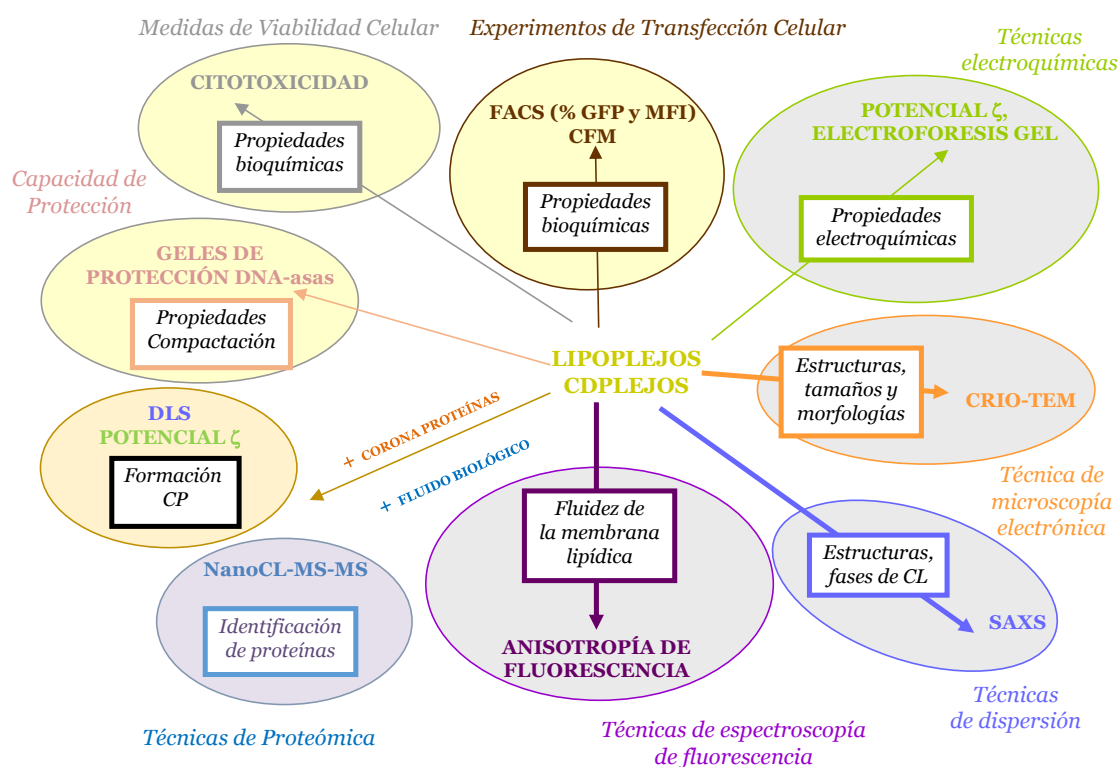
-La eficiencia de transfección TE, evaluada a través del % de proteína GFP expresada y de la intensidad media de fluorescencia de la GFP en las células, se determina mediante citometría de flujo o FACS y microscopía confocal de fluorescencia, CFM.

-El % de viabilidad celular o citotoxicidad de los complejos transfectados en las células se analiza por medio del ensayo de reducción del MTT o el ensayo con Alamar Blue.

-El perfil proteómico se analiza mediante técnicas de proteómica, como NanoLC-MS/MS.

Así, este planteamiento comprende un amplio conjunto de herramientas experimentales (descritas en el siguiente capítulo de esta Memoria), que, en conjunto, aportan una visión global muy completa del proceso de compactación y transfección de los agentes terapéuticos escogidos mediante el uso de los vectores propuestos.

El siguiente esquema (Figura 3.2) resume la metodología utilizada en esta Tesis Doctoral para la consecución de los objetivos marcados. Obsérvese que se han utilizado colores diferentes para distinguir las tareas asociadas con la caracterización biofísica de los lipoplejos (fondo gris), y las asociadas con la evaluación bioquímica *in vitro* de los lipoplejos/CDplejos previamente caracterizados (fondo amarillo). Con fondo púrpura, la metodología utilizada en la caracterización de la corona proteica (CP).



**Figura 3.2.** Herramientas experimentales utilizadas en esta Tesis Doctoral.



# CAPÍTULO 4

EXPERIMENTAL



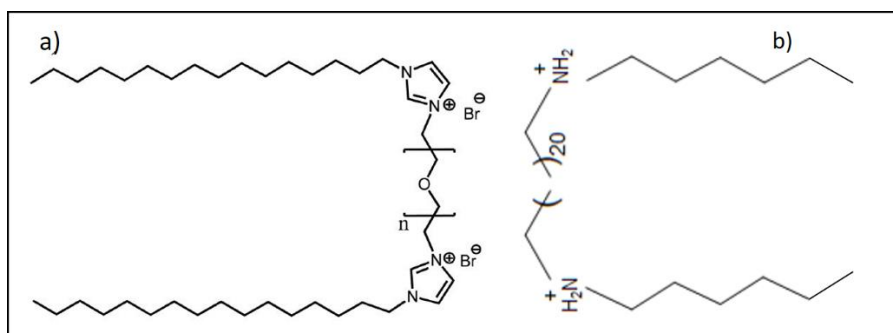
## 4.- EXPERIMENTAL

A continuación se describen los materiales utilizados en esta Tesis, así como la preparación de las muestras y las técnicas empleadas.

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. Lípidos Catiónicos (CLs y GCLs)

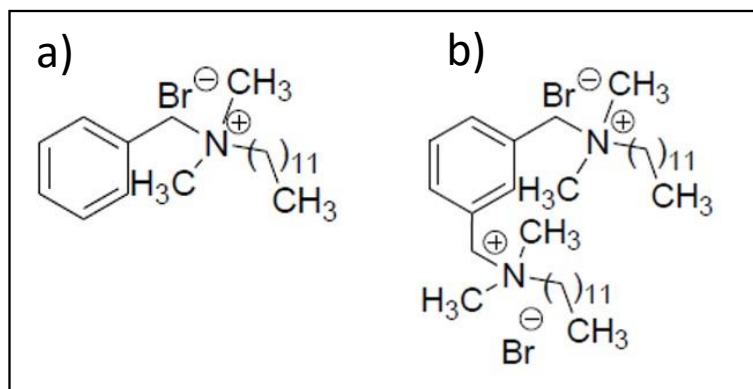
- Dibromuro de 1,2-bis (hexadecil dimetil imidazol) oligo-oxietileno. Serie de 3 lípidos tipo gemini del tipo  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ . Cada uno de ellos está constituido por dos cabezas polares catiónicas con un imidazol, separadas por un espaciador oxietileno de diferente longitud, siendo  $n = 1, 2$  o  $3$  el número de grupos oxietileno. Asimismo consta de dos cadenas alquílicas hidrofóbicas saturadas de 16 átomos de carbono. (Figura 4.1a). Estos compuestos se han sintetizado en el Laboratorio de Química Orgánica del Prof. S. Bhattacharya en el Indian Institute of Science, Bangalore (India).



**Figura 4.1.** Estructura de la serie de lípidos Gémini a)  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  ( $n = 1, 2$  o  $3$ ); y b)  $C_6C_{22}C_6$ .

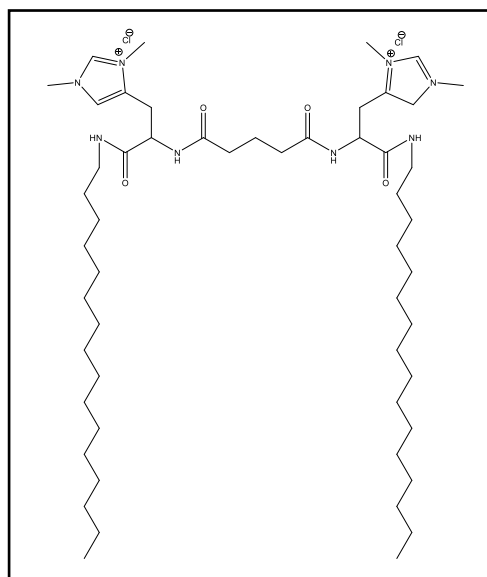
- Dibromuro de 1,22-bis (hexil dimetil amino) docosano ( $C_6C_{22}C_6$ ). Lípido tipo gemini-bolanfilico (GBA) que contiene dos cabezas catiónicas tipo amina secundarias, unidas a sendas cadenas hidrofóbicas cortas de 6 átomos de C, y conectadas por un espaciador largo de 22 átomos de C (Figura 4.1b). Este lípido fue sintetizado por el Prof. L. García Río en el Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña.
- Bromuro de N-bencil-N,N-dimetil-N-(1-dodecil) amonio (12PH). Lípido con una sola cabeza polar formada por un grupo amino y unidos a ella una cadena alquílica hidrofóbica saturada de 12 carbonos y un grupo fenilo (Figura 4.2 a). Este lípido fue sintetizado por la Prof. M. L. Moyá en el Laboratorio de Química Coloidal y Catálisis Micelar de la Universidad de Sevilla.
- Dibromuro de N-N'-(1,3-fenilen bis (metilen)) bis (N,N-dimetil-N-(1-dodecil) amonio (12PH12). Lípido tipo gemini derivado del anterior, constituido por dos grupos amino como cabeza polar, un grupo fenilo como espaciador y dos cadenas

alquílicas hidrofóbicas saturadas de 12 carbonos (Figura 4.2b). Fue sintetizado por la Prof. M. L. Moyá en el Laboratorio de Química Coloidal y Catálisis Micelar de la Universidad de Sevilla.



**Figura 4.2.** Estructura del lípido a) 12PH y b) 12PH12.

- Dicloruro de 1,5 bis(dimetilhistidina hexadecanoil amida) 1,5 pentanodiamida (C<sub>16</sub>His). Lípido gemini que incorpora restos del aminoácido histidina y constituido por dos cadenas hidrocarbonadas saturadas de 16 carbonos cada una, unidas entre sí por un espaciador con 4 grupos amida (Figura 4.3). Fue sintetizado por la Dra. L. Pérez, Grupo de Tensioactivos Biocompatibles del Instituto de Química Avanzada de Cataluña, CSIC (Barcelona).



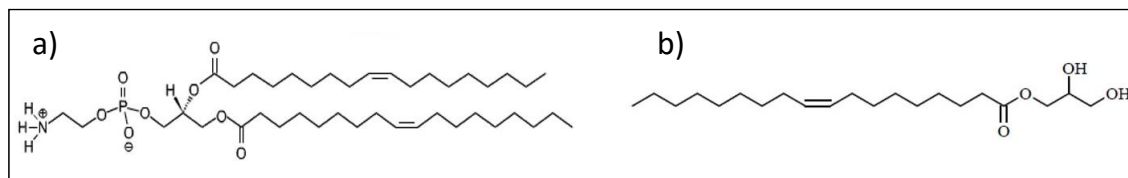
**Figura 4.3.** Estructura de lípidos derivados de los aminoácidos a) lisina y b) histidina.

#### 4.1.2. Lípidos Zwitteriónico y Neutro.

- 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE). Lípido perteneciente a las fosfatidiletanolaminas con dos cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos con una insaturación tipo *cis* en la posición 9. A pH = 7,4 (pH fisiológico) es eléctricamente neutro. Se ha usado junto con los lípidos catiónicos debido a sus propiedades fusogénicas que facilitan la fluidez de las bicapas lipídicas. Esto es debido a su capacidad para reducir la temperatura de transición gel-líquido de la mezcla de lípidos hasta temperatura ambiente ya que su  $T_m = -16^\circ\text{C}$ . Este lípido

comercial, suministrado por Avanti Polar Lipids Inc. (EE.UU.), con una pureza superior a 99%, en estado sólido, se ha mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

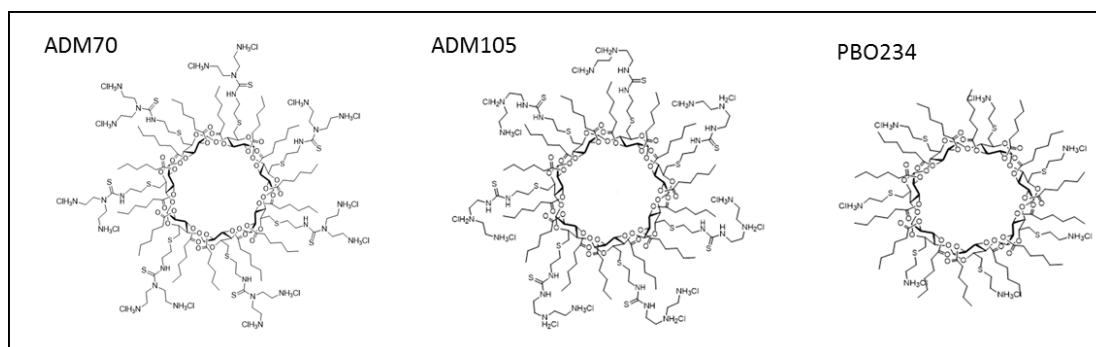
- Monoolein-rac-glicerol (MOG). Al igual que el DOPE, es un lípido coadyuvante. Se ha usado mezclado con lípidos catiónicos como vector de siRNA. Fue suministrado por Sigma-Aldrich, con una pureza superior a 99%, en estado sólido y se ha mantenido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.4.** Estructura de los lípidos a) zwitteriónico, DOPE y b) neutro, MOG.

#### 4.1.3 Vectores Macrocíclicos.

- Tetradecahidrocloruro de per-{6-S-(2-(N',N'-bis-(2-aminoetil)tioreido)etil)tió)-2,3-di-O-Hexanoil} ciclomaltoheptaosa (ADM70), Tetradecahidrocloruro de per-{6-S-(2-(N''-(N''-2-(2-aminoetil)aminoetil)tioreido)etil)tió)-2,3-di-O-hexanoil} ciclomaltoheptaosa (ADM105) y Heptahidrocloruro de per-{6-S-(2-aminoetil)tió)-2,3-di-O-hexanoil} ciclomaltoheptaosa (PBO234): grupo de 3 ciclodextrinas formadas por catorce grupos hexanoil que difieren en su disposición en la que aparecen colocados. Mientras que la ADM70 presenta 14 grupos amino primarios dispuestos de manera dendrítica, ADM105 los mantiene de forma lineal, siendo la PBO234 en la que presenta un "cluster" de grupos amino. Asimismo las ADM70 y ADM105 contienen 7 grupos tiourea. Estos compuestos fueron sintetizados por el grupo de los Profs. C. Ortiz Mellet y J. M. García Fernández en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla (IIQ).



**Figure 4.5.** Estructura de las ciclodextrinas a) ADM70, b) ADM105 y c) PBO234.

#### 4.1.4 Ácidos Nucleicos

- Ácido desoxirribonucleico (DNA). En esta Tesis Doctoral se han utilizado tres tipos de DNA:

- *DNA lineal*. Es un DNA liofilizado procedente de la glándula timo de ternera (ctDNA) en su forma de sal sódica, suministrado por Sigma-Aldrich Inc. (EEUU)

con una pureza superior al 95%. Presenta 2700 pares de bases determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa. Se ha conservado a 4 °C.

- Plásmido pEGFP-C3. Posee 4700 pares de bases y codifica para la expresión de la proteína GFP. Este plásmido se obtiene de la bacteria recombinante *E. Coli*, DH5 $\alpha$ . El plásmido se aisló y amplificó mediante el kit comercial GenElute HP Select Plasmid Gigaprep Kit de Sigma-Aldrich Inc. (EE.UU.). Posteriormente se liofilizó y se ha almacenado a 4 °C para su conservación. El plásmido fue preparado por la Dra. C. Aicart del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la UCM.

- Plásmido pCMV-Luc VR1216. Consta de 6934 pares de bases y codifica para la expresión de la proteína luciferasa. Al igual que el anterior proviene de la *E. Coli* y se amplió, aisló y purificó usando el kit Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen GMBH, Hilden, Germany). El plásmido fue preparado por la Lda. Laura Fernández Blanco del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Navarra

Las disoluciones de DNA (ctDNA o pDNA) se prepararon en HEPES 40 mM con concentraciones de DNA de 0,1 mg/mL para las medidas de potencial zeta, espectroscopia de fluorescencia y electroforesis en gel de agarosa; 2 mg/mL para las medidas de crio-TEM; 10 mg/mL para determinar las estructuras de los lipoplejos mediante la técnica de SAXS y 1 mg/mL para geles de protección de DNAsas, transfección y ensayos de viabilidad. Para preparar las disoluciones de DNA, se pesó la cantidad apropiada de DNA y se agregó el volumen requerido de disolución tampón o agua. A continuación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 h y 4 h para el ctDNA y pDNA, respectivamente. Pasado este tiempo, la disolución se almacenó a -30 °C para evitar una posible degradación.

- Ácido ribonucleico (RNA). Se ha utilizado un RNA de silenciamiento (siRNA) suministrado por Thermo Scientific Dharmacon. Es una molécula de doble hebra de 20 pares de bases con una secuencia 5' GCAAGCUGACCCUGAAGUUCdTdT 3' más dos terminales, dT, deoxitimidina. Inicialmente se preparó una disolución stock de 10 mg/mL en agua, la cual posteriormente se dividió en cantidades de 100  $\mu$ L y se almacenó a -80 °C. Las concentraciones utilizadas en las diferentes técnicas experimentales fueron las mismas que las previamente mencionadas para las disoluciones de DNA.

## 4.2. PREPARACIÓN DE VECTORES GÉNICOS

### 4.2.1. Preparación de los Películas Lipídicas

Los liposomas se prepararon siguiendo un protocolo desarrollado y optimizado en nuestro laboratorio basado en el procedimiento experimental propuesto por Lasic<sup>1</sup>, que consta de tres etapas:

- 1- Formación de la película lipídica (film).
- 2- Hidratación de la película lipídica y formación de liposomas unilamelares.
- 3- Homogeneización de los liposomas mediante extrusión.

En primer lugar, se pesa la masa requerida de lípido, en función de la relación de masas  $m_L / m_{DNA}$  entre la masa total de lípido ( $m_L$ ) y la de DNA ( $m_{DNA}$ ), o carga ( $\rho$ ) y de la composición del lípido catiónico en el liposoma mixto ( $\alpha$ ). La cantidad de lípido total ( $m_L = m_{L^+} + m_{L^0}$ ) requerida se obtiene a partir de las masa de los dos lípidos, el catiónico ( $m_{L^+}$ ) y el zwitteriónico ( $m_{L^0}$ ) y la masa de DNA que se desea preparar según se elija la composición ( $\alpha$ ). En todas las preparaciones la concentración de DNA se ha mantenido constante.

Una vez determinada la cantidad adecuada de cada lípido, se añaden unos 2 mL de cloroformo y se agita en un Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc. EE.UU). Mediante un evaporador-centrífuga Jouan RC10.09 (Société Jouan, Francia) se procede a eliminar el disolvente orgánico por evaporación a vacío. El proceso se realiza a 1200 rpm y a  $5 \cdot 10^{-4}$  atm durante 2 h y conduce a la formación de las películas secas muy finas de la mezcla lipídica en el fondo del tubo de vidrio o eppendorf. Para asegurar que no queden trazas del disolvente, las muestras se introducen durante una hora en un desecador a vacío. Finalmente, las películas se mantienen a  $-80^\circ\text{C}$  durante al menos 12 h antes de proceder a su hidratación.

En la siguiente etapa, la hidratación, se añade el volumen adecuado de HEPES 40 mM (pH = 7,4), y a continuación se aplican de manera alternativa 10 ciclos de agitación con Vortex (3 min) y sonicación (2 min). Por último, los liposomas se mantienen agitándose en Vortex durante aproximadamente 2 h para asegurar su hidratación y homogeneización, obteniéndose liposomas unilamelares con una baja polidispersidad.<sup>2</sup>

En la última etapa, para reducir el tamaño de los liposomas hasta 200 y 100 nm y disminuir al máximo la polidispersidad, se aplica un protocolo de extrusión secuencial con membranas de diferentes diámetros de poro, usando un Thermobarrel Lipex Extruder (Norher Lipids Inc., Canadá). En esta Tesis las muestras han sido extruidas con membranas de 400, 200 y 100 nm, sucesivamente.

#### 4.2.2. Preparación de Liposomas con Sondas Fluorescentes

Para las medidas de anisotropía de fluorescencia se necesita la intercalación en la bicapa de la sonda fluorescente difenilhexatrieno (DPH). Para ello, en un vial se añade el volumen apropiado de la disolución de la sonda en etanol ( $1,9 \cdot 10^{-4}$  M en etanol) y, una vez evaporado éste, se introduce en el vial la disolución de liposoma mixto, de modo que la relación molar final entre la cantidad total de lípido y la sonda DPH sea 200:1.

#### 4.2.3. Preparación de muestras de Ciclodextrinas anfífilas policatiónicas

En primer lugar, se prepara una disolución (1 mg/mL) de cada ciclodextrina en agua al 1% de DMSO. Para formar el correspondiente complejo se añade, para cada  $\rho$ , la cantidad necesaria de la disolución 1 mg/mL y sobre ella la cantidad apropiada de disolución de DNA (ctDNA o pDNA) previamente preparada en HEPES 20 mM.

#### 4.2.4 Preparación de Lipoplejos y CDplejos

Para preparar los lipoplejos, se añade sobre la disolución de liposoma mixto o sobre la de ciclodextrina, la cantidad adecuada de una disolución de DNA (ctDNA o pDNA) o siRNA. En el caso de lipoplejos la mezcla se dejará reposar 20 min, mientras que para los CDplejos se mantendrá 40 min antes de realizar la medida.

El volumen final de la mezcla depende de la técnica usada: para el potencial zeta, 1,6 mL; para electroforesis en gel de agarosa, 15-25  $\mu$ L; para anisotropía de fluorescencia, 2 mL; para SAXS, 50-75  $\mu$ L; para crio-TEM 0,5 mL; y para transfección, 100-200  $\mu$ L.

Para realizar la caracterización físico química de los compuestos, así como para llevar a cabo los experimentos de transfección y viabilidad celular de los sistemas en las condiciones óptimas, se han estudiado varias relaciones molares ( $\alpha$ ), de masas ( $m_L / m_{DNA}$ ) o de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) de los lipoplejos o CDplejos, dependiendo de la técnica utilizada.

### 4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 4.3.1. Potencial Zeta

Esta técnica es de gran importancia para poder evaluar la carga superficial de los complejos, ya que es crucial que estén cargados positivamente para una buena eficacia de interacción con la membrana celular.

Para determinar la movilidad electroforética se ha usado un equipo Zeta PALS (Phase Analysis Light Scattering; Brookhaven Instrum. Corp., EE.UU.) y un equipo Zetasizer NanoZS90 (Malvern U.K.). Estos equipos también han permitido determinar el tamaño de partícula: en el equipo ZetaPALS mediante la técnica de Dispersión Quasi-elástica de luz (QELS), y en el Zetasizer, mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

El potencial zeta ( $\zeta$ ) se obtiene a partir de la medida experimental de movilidad electroforética ( $\mu_e$ ) cuando las partículas cargadas se mueven en el seno de un campo eléctrico. Ambas propiedades están relacionadas mediante la ecuación de Henry:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon_r\varepsilon_0 f(\kappa_D a)} \mu_e \quad (4.1)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad de disolvente,  $\varepsilon_r$  y  $\varepsilon_0$  son las permitividades relativa y en el vacío, respectivamente, y  $f(\kappa_D a)$  la función de Henry, que depende del tamaño de partícula coloidal ( $a$ ) y del espesor de la atmósfera iónica o longitud de Debye<sup>3</sup> ( $1/\kappa_D$ ).

Los vectores estudiados en esta Tesis y sus correspondientes complejos con DNA, presentan un tamaño de partícula muy superior al espesor de la interfase electrificada que las rodea. Cuando esto ocurre, se puede aproximar la función de Henry a un valor límite,  $f(\kappa_D a) = 1,5$ . Esta aproximación de doble capa fina<sup>4</sup> o aproximación de Smoluchowski permite simplificar la ecuación 4.1:

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \mu_e \quad (4.2)$$

Para la caracterización electroquímica mediante la movilidad electroforética, así como las medidas de tamaño, se añade en una cubeta de plástico 1,6 mL de la disolución de lipoplejo o CDplejo preparada como se ha indicado anteriormente en el apartado 4.2.4. La medida se realiza a 25 °C y el valor final se obtiene como un promedio de 50 medidas independientes.

### 4.3.2. Electroforesis en Gel de Agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica utilizada para separar y caracterizar ácidos nucleicos basándose en la migración de moléculas con carga neta, que viene dada por los grupos fosfato. Esta velocidad de migración vendrá determinada por dos fuerzas: la eléctrica y la de rozamiento. En el caso del DNA de doble cadena, la carga neta está dada por los grupos fosfato, habiendo un grupo cargado negativamente por cada nucleótido. Además, al ser similar la masa de los distintos pares de bases, el cociente carga/masa es independiente de la secuencia y longitud de la cadena de DNA. Por tanto, las diferencias en la migración vendrán dadas únicamente por la fuerza de rozamiento. Como los fragmentos de DNA migran en el mismo medio y todos tienen la misma forma, la velocidad de migración tiene que ver únicamente con su tamaño. Los plásmidos pueden adquirir distintas conformaciones, más o menos enrolladas, que vendrán determinadas por la fuerza iónica del medio, siendo su velocidad de migración siempre menor que la del DNA de doble hebra lineal.

Para poder caracterizar los ácidos nucleicos, es necesario utilizar una sonda fluorescente inmersa en el soporte electroforético junto con el gel, para que su emisión a una determinada longitud de onda permita analizar, con la ayuda de una lámpara UV, las bandas correspondientes a los diferentes fragmentos de DNA. Habitualmente se utiliza bromuro de etidio o GelRed como sondas, puesto que su emisión experimenta un aumento apreciable cuando se intercalan entre los pares de bases del DNA, que les proporcionan un entorno hidrofóbico protector.

En esta Tesis la electroforesis en gel de agarosa se ha utilizado con tres objetivos:

- i) Determinación del tamaño promedio de los fragmentos de ctDNA y del tamaño del pDNA utilizado.
- ii) Determinación cualitativa de la composición del lipoplejo o CDplejo para la que se da la electroneutralidad. Una vez aplicado el campo eléctrico, la presencia de bandas fluorescentes a lo largo del carril evidencia que no todo el DNA está compactado por el vector, quedando intercalado la sonda fluorescente entre sus pares de bases. Por el contrario, si no se observan esas bandas, el DNA está totalmente compactado, estando toda la sonda fluorescente en el seno de la disolución donde la fluorescencia decae bruscamente.
- iii) Evaluación de la protección del pDNA frente a su degradación enzimática por DNAsas. En este experimento, la DNasa I degrada todo el DNA libre. Por tanto si, finalizado el experimento y realizada la descomplejación del DNA añadiendo dodecilsulfato de sodio (SDS), la DNasa I ha tenido acceso a todo el pDNA no se observará ninguna banda puesto que el plásmido habrá sido degradado. Sin

embargo, si se observan las bandas del pDNA se puede afirmar que el vector ha complejado al DNA eficazmente ya que las DNAsas no han tenido acceso.

Para realizar la electroforesis en gel de agarosa, se prepara primero el gel de agarosa al 1% en TAE 1X (Tris-HCl, Acetato y EDTA), y se añaden 0,7  $\mu$ L de GelRed. Cuando el gel ha solidificado, se añade el lipoplejo previamente formado en un volumen total de 15-20  $\mu$ L. Como control se prepara también un carril con pDNA sin liposoma mixto.

En el caso de los geles de protección frente a DNAsas, el gel se prepara al 1% en TBE 1X (Tris- HBO<sub>3</sub>-EDTA) y una vez disuelto el gel se añaden 0,7  $\mu$ L de bromuro de etidio. Por otro lado, una vez preparados el lipoplejo se separan 40  $\mu$ L y a los que se añaden 2  $\mu$ L de una disolución de DNAsas que tiene 212 unidades de DNAsas por  $\mu$ L. Se incuban durante 2 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se añaden 4  $\mu$ L de EDTA a cada muestra incubada para parar la acción de las DNAsas y pasados 15 min se añade 5  $\mu$ L de SDS al 25% para descomplejar el DNA.

Una vez cargadas las muestras, la electroforesis se lleva a cabo con una corriente eléctrica de 80 mV durante 30 minutos. Después el gel se retira de la cubeta y se revela bajo luz ultravioleta usando un equipo XR instrument (Bio-Rad) y el software comercial GelDoc (Bio-Rad).

### 4.3.3. Anisotropía de Fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia se basa en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos mediante luz polarizada. Cuando una población de moléculas se irradia con luz linealmente polarizada, tendrán más probabilidad de ser excitadas aquellas cuyo dipolo de adsorción sea paralelo a la dirección de polarización, lo que se conoce como fotoselección.<sup>5</sup> Esta excitación selectiva da lugar a una población de fluoróforos parcialmente orientada y una emisión de fluorescencia parcialmente polarizada. La anisotropía de fluorescencia ( $r$ ) se calcula según la ecuación

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (4.3)$$

donde  $I_{VV}$  y  $I_{VH}$  son las intensidades de fluorescencia de la emisión polarizada vertical y horizontalmente, cuando la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente y G es un factor de corrección del instrumento.<sup>5</sup> En esta Tesis se han realizado medidas de anisotropía de fluorescencia para determinar la fluidez de la membrana de liposomas y lipoplejos, usando la sonda fluorescente DPH. Una disminución de la rigidez de la membrana genera una mayor capacidad de rotación de la sonda, lo que conlleva a una disminución de la anisotropía.<sup>5-7</sup> El equipo utilizado ha sido un espectroscopio Perkin Elmer LS50B y controlado por el software FL Winlab.

Las medidas se realizan a diferentes temperaturas comprendidas entre 10 y 40 °C. A cada temperatura y a la longitud de emisión asignada, se recogen valores de intensidad durante 3 min. Tanto la excitación como la emisión estarán polarizadas con los polarizadores vertical-vertical ( $I_{VV}$ ) y vertical-horizontal ( $I_{VH}$ ). Una vez conocidos los valores del factor G de cada disolución a las longitudes de



onda de excitación y emisión fijadas, los valores de intensidad se pueden convertir automáticamente en valores de anisotropía usando la ecuación 4.3. El valor del factor G se determina como la media de 10 valores experimentales obtenidos como la relación entre las intensidades de fluorescencia polarizada en la excitación y en la emisión con los polarizadores situados horizontal-vertical ( $I_{HV}$ ) y horizontal-horizontal ( $I_{HH}$ ).

Las medidas se han realizado a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) de 360 nm y una longitud de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 430 nm. La apertura de las rendijas de excitación y emisión ha sido entre 2,5 y 5,0 nm y la velocidad de barrido 240 nm/min.

#### 4.3.4. Criomicroscopia Electrónica de Transmisión (Crio-TEM)

La microscopia electrónica se basa en la interacción de los electrones con la materia cuándo se incide sobre ésta un haz electrónico coherente y suficientemente acelerado. La principal ventaja que presenta este tipo de microscopia es que alcanza una gran amplificación de la imagen de la muestra con una resolución casi mil veces mayor que con el microscopio óptico, gracias a que la fuente de iluminación utilizada es un haz de electrones. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente. Todos los electrones son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD, que puede tener miles de aumentos y una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento.

Se obtiene una distribución heterogénea de densidad electrónica, que se corresponde al grado de dispersión de los electrones incidentes. La imagen obtenida aporta información sobre las características morfológicas y estructurales del compuesto estudiado, tanto si ésta es amorfa o cristalina.

La criomicroscopia electrónica de transmisión (crio-TEM) se basa en vitrificar la muestra a fin de conseguir un mejor contraste y disminuir los daños causados por radiación. Provocando congelaciones ultrarrápidas, se consigue que el agua permanezca en forma vítrea, con lo que se evita la presencia de cristales de hielo que dañen la muestra. Esto no supone ninguna limitación a la resolución ya que la muestra se mantiene en la disolución fisiológica inicial.

En esta Tesis se ha utilizado esta técnica haciendo uso del microscopio JEOL JEM-2011 del Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Las muestras se prepararon de acuerdo al apartado 4.2.1 y una vez formados los complejos se siguió el procedimiento general propuesto por Dubochet et al.,<sup>8</sup> Bednar y Woodcock,<sup>9-11</sup> y Llorca et al.,<sup>11</sup> descrito brevemente a continuación.

Se toma una rejilla de cobre perforada recubierta de carbón (Quantifoil R1.2/1.3), diámetro de poro de 1,2  $\mu\text{m}$ , con 400 agujeros cada una) y se aplica una descarga iónica sobre ella (Agar Scientific Ltd., Reino Unido) durante 1 min para favorecer así la adsorción de la muestra sobre su superficie. Se deposita 5  $\mu\text{L}$  de muestra sobre la rejilla y se elimina el exceso con un papel de filtro durante 5 s. Para vitrificar la muestra, se sumerge la rejilla con la muestra en etano líquido a -180 °C, utilizando un sistema de criotransferencia Gatan 626 (Gatan Inc., EE.UU.). Las imágenes se obtienen operando a 200 kV y usando diferentes grados de

desenfoco (500-700 nm) para obtener un contraste de fase adecuado. Las imágenes se graban con una cámara digital Multiscan Gatan 794 y los archivos se guardan en formato dm3.

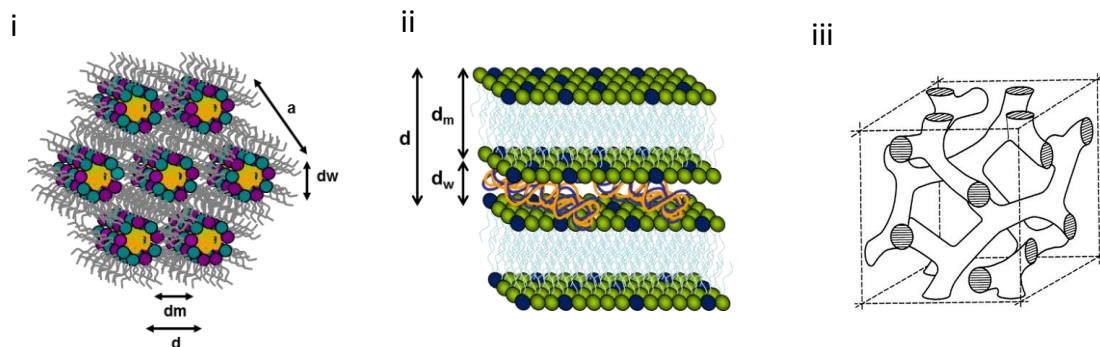
#### 4.3.5. Dispersión de Rayos X a Bajo Ángulo (SAXS)

Mediante esta técnica se puede obtener información como la estructura, tamaño o cristalinidad de la muestra. Estos parámetros son de gran relevancia puesto que tienen una clara influencia en la eficiencia de los vectores en la transfección celular (relación estructura-actividad biológica).

Con esta técnica se obtiene la intensidad ( $I$ ) y el vector de dispersión de ondas,  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ), los cuáles se representan formando difractogramas, es decir, los máximos de difracción de Bragg, y a partir de ellos se pueden asignar los índices de Miller característicos ( $hkl$ ) y el tipo de fase y estructura que presenta la muestra. El vector de dispersión de ondas,  $q$ , refleja el proceso en el cual los fotones de los rayos X transfieren energía a los electrones con los que interaccionan. La siguiente ecuación describe la relación de la longitud del vector de dispersión,  $q$ , y el ángulo de dispersión,  $2\theta$  ( $\lambda = 0,995 \text{ \AA}$ ,  $E = 12,6 \text{ KeV}$ ) a través de la siguiente ecuación 4.4.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (4.4)$$

Existe una amplia información estructural de liposomas y lipoplejos en la literatura. Está documentado que, en una primera etapa, los segmentos de DNA cubren la superficie de los liposomas catiónicos por la acción de una fuerte interacción electrostática entrópicamente dirigida, como se ha comentado en el apartado anterior. En una segunda etapa y en la región más concentrada del diagrama de fases, las bicapas de fosfolípidos de los liposomas se rompen y se reorganizan originando distintas fases de cristal líquido liotrópico, que aparecen esquematizadas en la Figura 4.6: i) fase hexagonal inversa,  $H_{II}^c$ ; ii) fase lamelar,  $L_\alpha$ ; y iii) fase cúbica bicontinua,  $V_I$ .



**Figura 4.6.** Estructuras o fases de cristal líquido liotrópico más habituales en lipoplejos: i) micelas cilíndricas inversas en estructura hexagonal,  $H_{II}^c$ ; ii) fase lamelar,  $L_\alpha$ ; y iii) fase cúbica bicontinua,  $V_I$ .

La figura 4.6 presenta un esquema de las tres estructuras habitualmente encontradas en estos sistemas. Como puede verse claramente en la figura, la fase  $L_\alpha$  se caracteriza por bicapas lipídicas en disposición de multicapa, separadas

entre sí por una monocapa acuosa donde se compacta en disposición tipo sandwich las dobles hélices de ctDNA o los plásmidos pDNA superenrollados. En cambio, la fase  $H_{II}^c$  se caracteriza por ser una fase inversa (o reversa) en la que la mezcla de lípidos (catiónico/neutro) se auto-organizan en forma de micelas cilíndricas inversas en empaquetamiento hexagonal. Al ser una fase inversa, las cabezas polares catiónicas de los lípidos están dirigidas hacia el interior de los cilindros; por consiguiente, el biopolímero cargado negativamente se aloja en el interior de dichos cilindros. Por último, la fase cúbica bicontinua  $V_l$  es una fase de cristal líquido liotrópico no convencional, en el sentido de que los lípidos se autoagregan formando canales lipídicos continuos con las cabezas catiónicas dispuestas también hacia el interior, que, por tanto será donde se sitúe el biopolímero. Las fases cúbicas aparecen cuando el complejo se forma con siRNA, debido al menor tamaño de éste que le permite ubicarse en un espacio más reducido.

A partir del valor de  $q$  de los máximos de difracción observados en los difractogramas, es posible obtener el espaciado de la red para cada tipo de fase.

A su vez, la distancia  $d$ , que en el caso de la fase  $L_\alpha$  es la distancia entre bicapas lipídicas y en el caso de la fase  $H_{II}^c$  es la distancia entre centros de cilindros (también denotada como  $a$ ), se puede desglosar en:

$$d = d_m + d_w \quad (4.5)$$

donde  $d_m$ , es el espesor de la bicapa lipídica y  $d_w$ , el espesor de la fase acuosa (ver Figura 4.6) donde se aloja el ácido nucleico.

El espesor de la bicapa lipídica ( $d_m$ ) se puede medir experimentalmente con técnicas como crio-TEM, por lo que, a partir del valor  $d$  obtenido por SAXS, se puede utilizar la ecuación 4.5 para calcular  $d_w$ , valor que debe ser de un espesor suficiente para alojar el DNA o el siRNA, y que nos informará del grado de compactación del biopolímero.

Por otro lado, el máximo de difracción que no está relacionado con ninguna fase, corresponde a la correlación DNA-DNA, y su vector de ondas  $q_{DNA}$ , permite obtener la separación entre las dobles hélices de DNA ( $d_{DNA}$ ) en la región acuosa de la fase lamelar  $d_{DNA} = 2\pi / q_{DNA}$ . Cabe mencionar que en la fase hexagonal,  $d_{DNA} = d = a$ , es decir, como las hélices de DNA se alojan en el interior de las micelas cilíndricas inversas, la distancia a la que se sitúan es, forzosamente, la misma que la distancia entre centros de cilindros, es decir, la periodicidad ( $d$ ) característica de la estructura.

Los experimentos de SAXS se llevaron a cabo en la línea BL11-NCD del sincrotrón ALBA, Barcelona. Para las medidas de SAXS, se usan capilares de vidrio de 1,5 mm de diámetro con un grosor de pared de 0,01 mm (Hilgenberg, Alemania). La cantidad necesaria de liposoma mixto o ciclodextrina y de pDNA se introduce en los capilares obteniendo la relación de cargas efectivas ( $\rho_{eff}$ ) apropiada teniendo en cuenta que el volumen máximo del capilar son 70  $\mu$ L. Posteriormente, los capilares se centrifugan durante 15 min a 4900 rpm para favorecer la aparición

de sólido en el fondo. Finalmente los capilares se sellan y se guardan a 4 °C hasta su análisis en SAXS. En el sincrotrón las medidas se realizan colocando los capilares verticalmente en un soporte adecuado que se ubica en la cabina de medida de SAXS entre el haz de rayos X y el detector.

#### 4.3.6. Nanocromatografía de Líquidos Acoplada a Detector de Masas- Masas (nano LC-MS/MS)

Esta es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en proteómica para el análisis de proteínas, puesto que permite su separación e identificación de forma rápida y con un alto grado de selectividad, sensibilidad y resolución. Gracias al desarrollo y acoplamiento de microcolumnas y nanosprays a las técnicas tradicionales de LC y MS, se ha podido desarrollar la técnica de nano LC-MS/MS, que ha incrementado ampliamente la sensibilidad y resolución del análisis de proteínas en muestras complejas.<sup>12</sup>

El sistema nano LC-MS/MS consta de dos procesos acoplados: una cromatografía 2D en fase líquida y una espectrometría de masas. La cromatografía 2D-LC consiste en la separación de los péptidos por la acción de dos columnas, la primera es de intercambio catiónico y la segunda de fase reversa, cuya salida se somete a la detección final mediante un espectrómetro de masas.

Mediante la espectrometría de masas (MS) se puede identificar cada proteína con una elevada precisión. En la técnica MS, primero se vaporiza la muestra mediante alto vacío y una fuente de calor, y seguidamente se ioniza y fragmenta con diferentes métodos, como bombardeo con una corriente de electrones a alta velocidad (EI), métodos de “electrospray” (ESI) o ionización por láser (MALDI). Los iones producidos son dirigidos a un tubo analizador sobre el que se recogen sus impactos. Sobre este analizador se aplica un campo electromagnético de modo que el movimiento del ión será directamente proporcional a su masa e inversamente proporcional a su carga eléctrica. El resultado es un espectro de masas en el que se representa la abundancia del ión respecto a su relación  $m/z$ , del que se puede deducir el peso molecular (MW). La separación de los diferentes iones se basa en la relación:

$$\frac{m}{z} = \frac{H^2 \gamma^2}{2V} \quad (4.6)$$

Por último, para realizar la identificación de las proteínas se utilizan los programas informáticos MASCOT y SEQUEST. Estos algoritmos comparan los datos de  $m/z$ , de los iones previamente obtenidos, con las bases de datos de proteínas disponibles (SwissProt, NCB). Según el grado de similitud entre la proteína de la muestra y la presente en la base de datos, cada algoritmo asigna un puntaje y el porcentaje de cobertura de la proteína a partir de los péptidos identificados.

En esta Tesis, esta técnica se ha utilizado para analizar la composición cualitativa y cuantitativa de las coronas proteicas de varios CDplejos. Para ello se usó el nanoLC-MS/MS Dionex Ultimate 3000 instruments (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), con automuestreador termostatzado y el detector de espectrometría de masas LTQ-orbitrap XL instrument (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany)

el software “Proteome Discoverer (1.2 version, Thermo Scientific) for database search using Mascot” (versión 2.3.2 Matrix Science).

Después de incubar las muestras con suero se procede a su lavado, y el pellet obtenido se resuspende en 50  $\mu$ L de una disolución de urea 8 M en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM (pH = 7,8). A continuación, se añaden 2,5  $\mu$ L de diclorodifenil tricloroetanol (DTT) 200 mM con 10  $\mu$ L de iodoacetamina (IAA) 20 mM y la muestra se diluye en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM para tener una concentración final 1M de urea. Para realizar la digestión de la mezcla, se añaden 5  $\mu$ L de tripsina y se deja incubando toda la noche en un baño a 37 °C. La reacción enzimática se detiene añadiendo 2  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA), se agita durante 3 s y por último se centrifuga durante 1 min a 14000 rpm.

Una vez digeridas las muestras, se procede a realizar la desalación, mediante el uso de una columna de sílice SPE C18, para extracción en fase sólida. La columna se lava con 1 mL de acetonitrilo (ACN) y se acondiciona con 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v). A continuación, se pasa la muestra a través de la columna y se eluye con 500  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN (50:50 v/v) 0,05% TFA. Finalmente, se elimina el disolvente en un Speed-Vac (mod. SC 250 express, Thermo Savant, Holbrook) y se reconstituye la muestra con 100  $\mu$ L  $\text{HCOOH}$  0.1%, con lo que ya puede ser analizada o conservada a -80 °C hasta su análisis.

Para el análisis en nanoLC-MS/MS, se preconcentran 5  $\mu$ L de muestra en una  $\mu$ -precolumna (Dionex) usando como fase móvil una mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 98:2 (v/v) con 0.1% de ácido acético, a un flujo de 10  $\mu$ L/min. La mezcla de péptidos se separa en una columna de sílice 75  $\mu$ m x 100 mm que opera a 250 nL/min. La separación se realiza con gradiente de elución, manteniendo los primeros 5 min una fase isocrática  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 95:5 e incrementando linealmente a  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 65:35 en 75 min,  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 20:80 durante de 10 min y finalmente a  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN 5:95 durante otros 10 min para limpiar la columna. De cada muestra se han realizado 5 medidas que han sido posteriormente analizadas con el software Proteome Discoverer.

#### 4.3.7. Estudio de Transfección

Los experimentos de transfección se han llevado a cabo en las líneas celulares MCF-7 (línea celular humana de cáncer de mama), HeLa (línea celular humana de cáncer cervical) y COS-7 (línea celular de riñón de mono). En los experimentos de transfección con las CDs (con y sin plasma humano (HP)) se han utilizado las líneas celulares HeLa y MCF-7. Las placas utilizadas fueron de 24 pocillos poniendo 200.000 células por pocillo. Para HP se añadió 1 mL de medio Optimem con 10% de FBS durante 24 h.

Los experimentos de transfección con los vectores lipídicos se han llevado a cabo en la línea celular COS-7. Las placas utilizadas fueron 48 pocillos, teniendo cada uno de ellos ~100.000 células. El tratamiento con los vectores lipídicos se añadió pasadas 24 h de su incubación.

Cuando los cultivos celulares alcanzan su límite de confluencia, se añaden los complejos vector génico-DNA previamente formados con las cantidades apropiadas para 1  $\mu$ g de DNA por pocillo. Se debe añadir la cantidad adecuada

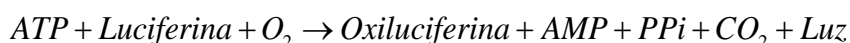
de medio (Optimem o DMEM) con objeto de tener un volumen final de 600  $\mu\text{L}$  en cada pocillo.

Transcurridas 4 h de añadir los complejos, se elimina la disolución de cada pocillo, se añade medio nuevo y se deja incubando 42 h más. Pasadas las 48 h totales desde el inicio de la incubación se realizan los experimentos de cuantificación de transfección por luminometría o FACS, y de viabilidad celular mediante ensayos de Alamar Blue.

#### 4.3.7.1. Luminometría

Esta técnica permite medir la cantidad de luciferasa por bioluminiscencia. Cuando la transfección se ha producido de manera exitosa con el pDNA que codifica para la proteína luciferasa, ésta se expresará dentro de las células. Por ello es necesario extraerla de las células utilizando un tampón de lisis.

Posteriormente, la reacción entre Adenosín Trifosfato (ATP) y luciferina catalizada por la luciferasa produce oxiluciferina como producto emisor de radiación según:



Por tanto, midiendo la luminiscencia producida por la oxiluciferina se obtiene, de manera directa, la actividad catalítica de la luciferasa y, de manera indirecta, la cantidad de luciferasa presente en las células.

Las células se lavan con un tampón salino de fosfato (PBS) y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de un tampón de lisis (Promega, Madison, Winconsin, USA) dejándolo actuar 10 min, seguido por dos ciclos de congelación-descongelación. Las células lisadas se pasan a eppendorff y se centrifugan a 1200 rpm. Del sobrenadante se utilizan 20  $\mu\text{L}$  para el ensayo de la actividad total de la luciferasa usando el producto comercial “Luciferasa assay reagent” específico de Promega con su respectivo protocolo. Para el análisis se ha usado un luminómetro (Sirius-2; Berhold Detection System, Innogenetics, Diagnóstica y Terapéutica, Barcelona, Spain). Para la cuantificación de la proteína se han utilizado los reactivos de Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

#### 4.3.7.2. Citometría de Flujo (FACS)

La citometría de flujo es una técnica que permite que las células pasen en fila dentro de un flujo a través del citómetro, permitiendo la medición de distintas características físicas de una sola célula. Al mismo tiempo se pueden separar las distintas poblaciones celulares de la muestra analizada. Se pueden obtener datos como el tamaño relativo de las células, granularidad, complejidad interna e intensidad relativa de fluorescencia, usando propiedades intrínsecas de la célula como la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia.

El equipo de medida de FACS requiere de una fuente de luz (lámpara de mercurio o láser), flujo celular, unidad de filtros ópticos para la detección de longitudes de onda específicas, fotodiodos o fotomultiplicadores para la amplificación de la señal, y una unidad de operación y procesamiento de datos. El equipo utilizado ha sido el citómetro de flujo Calibur 345, (Fullerton, CA, EE.UU.) y los datos se han procesado mediante el software FloJo 9.3.

En esta Tesis Doctoral, se ha empleado la técnica de FACS para evaluar si el vector catiónico utilizado es capaz de expresar o silenciar la proteína GFP indicada en las células vivas, y la eficiencia que muestra en dichos procesos.

Esta eficiencia se mide sobre el nivel de expresión de GFP obtenido:

- i) El % de GFP, que es una medida de la expresión de la GFP en las células transfectadas con respecto a la emisión fluorescente residual de las células, es decir, nos informa del % de células transfectadas.
- ii) La MFI (mean fluorescent intensity) que es indicativo de la intensidad promedio de la fluorescencia por célula.

Pasadas 48 h de tiempo de incubación de las células con el medio, la placa se saca de la incubadora, se elimina el medio de cada pocillo y, después de un par de lavados con un tampón (PBS al 0,5% BSA y 2,5 mM de EDTA), se añaden 200  $\mu$ L de 1X de tripsina. Se introduce en el incubador durante 1 min y una vez fuera, se adicionan 400  $\mu$ L de medio para neutralizar. La disolución de células se pasa a tubos de citómetro y se centrifuga a 1450 rpm a 4 °C. Posteriormente se retira el medio y se añaden 200  $\mu$ L de tampón, se vuelve a centrifugar y finalmente se resuspende en 500  $\mu$ L de tampón.

En todos los estudios de transfección del plásmido DNA realizados con FACS en las distintas líneas celulares, se ha utilizado Lipofectamina2000\* como control positivo.

#### 4.3.8. Estudio de Silenciamiento

Las líneas celulares utilizadas para el estudio de silenciamiento han sido HEK293T (células embrionarias de riñón), HeLa (línea celular humana de cáncer cervical) y H1299 (línea celular humana de carcinoma de pulmón).

Las células se siembran en placas de 24 pocillos, cultivando ~60.000 células en un volumen final de 400  $\mu$ L de DMEM con 10% FBS (150 células/  $\mu$ L). Las células se dejan incubando en la placa durante 24 h antes de añadir los lipoplejos previamente formados con las cantidades apropiadas para 1  $\mu$ g de DNA por pocillo. Transcurridas 4 h, se elimina la disolución de cada pocillo, se añade medio nuevo y pasadas las 48 h totales de incubación se realizan los experimentos de cuantificación de la viabilidad celular mediante ensayos MTT.

En este tipo de estudio, el proceso descrito se lleva a cabo con un siRNA antiGFP para analizar la disminución regulada de la expresión relativa de EGFP en cada línea celular. Además, se utiliza Lipofectamina2000\* con el siRNA antiGFP como control positivo y Lipofectamina2000\* con un siRNA no dirigido como control negativo.

Posteriormente, se lleva a cabo todo el proceso mediante FACS, como se ha descrito previamente en el apartado 4.3.7.2.

Tanto los estudios de silenciamiento como los de transfección con las CDs se ha llevado a cabo en presencia y ausencia de suero con células *in vitro*, cubriendo un amplio intervalo de los parámetros estudiados en la caracterización previa, es decir, a distintas fracciones molares del vector lipídico mixto ( $\alpha$ ) y a distintas cargas efectivas ( $\rho_{\text{eff}}$ ) del lipoplejo. El objetivo es correlacionar las condiciones

óptimas de transfección y/o silenciamiento con determinadas características estructurales del lipoplejo utilizado, de tal forma que se pueda obtener una relación estructura-actividad biológica que permita en el futuro predecir la potencial capacidad de un determinado vector génico.

#### 4.3.9. Ensayo de Viabilidad Celular

En esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo dos ensayos diferentes de viabilidad celular: ensayo MTT y Alamar Blue.

El ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT),<sup>13</sup> se basa en la reducción del MTT soluble por parte de la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán.

La capacidad de las células para reducir el MTT es indicativo de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, y da la medida de viabilidad celular de la toxicidad, es decir, se puede cuantificar el % de células que son activas metabólicamente.<sup>14</sup>

El % de viabilidad celular se determina con un espectrofotómetro a una longitud de onda entre 500-600 nm. Los resultados se expresan en % de células vivas:

$$\%Viabilidad = \frac{A_{592} - A_{592control(DMSO)}}{A_{controlcelular} - A_{592control(DMSO)}} \times 100 \quad (4.7)$$

Se utiliza un control del medio celular no tratado, un control positivo (compuesto con citotoxicidad conocida) y otro negativo (el disolvente).

La curva dosis-respuesta se calcula a partir del intervalo de concentración utilizado y el % de reducción del crecimiento celular. Se debe calcular la concentración a la cual se produce la reducción de la viabilidad celular en un 50%, es decir, los valores de comparación se hacen sobre una base del 50% de inhibición del crecimiento (IC<sub>50</sub>) en las células tratadas con los agentes específicos. A partir de la curva dosis-respuesta, se deduce la efectividad del lipoplejo en causar la muerte o en cambiar el metabolismo de las células. Para ello se compara la cantidad de formazán producido por las células tratadas, con el lipoplejo con la cantidad de formazán producido por otras células: (a) no tratadas, que sirve de referencia, y (b) Lipofectamina2000\*, que sirve como control positivo.

Para los estudios de viabilidad celular MTT, se usan placas de 96 pocillos. Una vez pasado el tiempo de incubación de las células con los complejos, se añaden 20 µL del reactivo MTT 4% en DPBS (5 mg/mL) sobre la disolución celular sin eliminar el medio anterior en el que se encontraban las células y se incuba durante 4 h en oscuridad. A continuación se elimina el medio y se adicionan 200 µL de DMSO y se deja reposar 5 min a temperatura ambiente antes de su medición con el software Microplate Analyst del MTT BIO-RAD modelo 680. Cuando el MTT se encuentra en forma reducida, es decir, como formazán, la intensidad de absorbancia que se obtiene es máxima en el interior de las células



vivas. No obstante, si la coloración es amarilla, el formazán no se habrá reducido indicando la ausencia de células vivas.

Por otro lado, el ensayo con Alamar Blue se basa en el poder reductor que tienen las células vivas para convertir la molécula resazurina, en otra fluorescente, la resorufina. Esta reducción ocurre cuando la resazurina entra en las células vivas, produciéndose una fluorescencia roja. Debido a que la resazurina es un compuesto no tóxico, se puede seguir el ensayo de transfección después de haber añadido el Alamar Blue.

En este caso la absorbancia es proporcional al número de células vivas y se corresponde con la actividad metabólica celular. El % de viabilidad celular se determina con un espectrofotómetro midiendo a dos longitudes de onda, 570 y 600 nm. Los resultados se expresan en % de células vivas:

$$\%Viabilidad = \frac{A_{570} - A_{600\text{celulastratadas}}}{A_{570} - A_{600\text{control}}} \times 100 \quad (4.8)$$

Cuando se usa Alamar Blue, pasado el tiempo de incubación de las células con los complejos, se retira el medio y se añade 1 mL de medio con un 10% de Alamar Blue y se deja incubando a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se retiran 200 µL de cada pocillo, se pasan a una placa de 96 pocillos y se realiza la medición con el espectrofotómetro a dos longitudes de onda.

#### 4.3.10. Microscopia Confocal de Fluorescencia (CFM)

Esta técnica nos permite determinar la eficacia de transfección de muestras mediante marcaje fluorescente, haciendo secciones ópticas de las mismas mediante la excitación de la muestra punto a punto por medio de un barrido. Es una técnica no destructiva que permite obtener resoluciones microscópicas subcelulares, ya que es capaz de analizar la luz obtenida en un mismo plano del espacio tridimensional. El microscopio y el sistema óptico enfocan la luz emitida por el punto focal sobre un segundo plano, el punto confocal, y de éste llega al detector a través del diafragma que es una pequeña abertura situada frente al detector que elimina de forma óptica toda la información que se encuentra fuera del plano focal (debido a que provoca una difuminación y pérdida de nitidez de la imagen) por lo que sólo la información que se encuentre dentro de este plano será detectada con calidad.

La microscopia confocal permite identificar y localizar componentes celulares *in vivo*. En esta Tesis se ha utilizado para discernir si en las células transfectadas se ha liberado el plásmido de DNA y se ha expresado la proteína para la cual codifica, en este caso, la GFP. Antes de observarse al microscopio, los núcleos celulares se tiñen con ioduro de propidio (PI), utilizando posteriormente filtros coloreados sensibles al rojo (PI) para los núcleos o al verde para el pDNA (GFP). Si el plásmido no se libera ni expresa, se observa la coloración roja, mientras que si las células tienen una coloración verde, la mayor parte del plásmido se ha liberado y expresado. Si la coloración se encuentra entre amarillenta y anaranjada, no todo el plásmido ha sido liberado y expresado.

En esta Tesis, se ha utilizado el microscopio Zeiss LSM 510-META, ubicado en Indian Institute of Science, IISc, Bangalore que es un microscopio confocal espectral.

Pasadas 48 h de incubación del cultivo celular se retira el medio y se lava con una disolución de DPBS y se incuba a T ambiente durante 10 min. A continuación, se retira la disolución y se añade p-formaldehído al 4% incubando también durante 10 min. Posteriormente, el cultivo celular se incuba con Triton-x-100 al 0,1% para aumentar la permeabilización de la membrana y facilitar la entrada de la sonda. Seguidamente se añade yoduro de propidio para teñir de manera específica y se lava nuevamente con DPBS para eliminar el exceso. Finalmente las muestras se preparan en cubreobjetos y se llevan a un microscopio Zeiss LSM 510-META.

## 4.4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- (2) Feitosa, E.; Alves, F. R.; Niemiec, A.; Oliveira, M. E. C. D. R.; Castanheira, E. M. S.; Baptista, A. L. F. *Langmuir* **2006**, 22, 3579.
- (3) Delgado, A. V. *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*; Marcel Dekker: New York, 2002; Vol. 106.
- (4) Ohshima, H.; Furusawa, K. *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements, and Applications*; Marcel Dekker: New York, 1998.
- (5) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Acad./Plenum: New York, 1999.
- (6) Borenstain, V.; Barenholz, Y. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, 64, 117.
- (7) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Langmuir* **2009**, 25, 4402.
- (8) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowall, A. W.; Schultz, P. Q. *Rev. Biophys.* **1988**, 21, 129.
- (9) Bednar, J.; Woodcock, C. L. *Chromatin*; Academic Press Inc: San Diego, CA, 1999; Vol. 304.
- (10) Bednar, J.; Studitsky, V. M.; Grigoryev, S. A.; Felsenfeld, G.; Woodcock, C. L. *Mol. Cell* **1999**, 4, 377.
- (11) Llorca, O.; McCormack, E.; Hynes, G.; Grantham, J.; Cordell, J.; Carrascosa, J. L.; Willison, K. R.; Fernández, J. J.; Valpuesta, J. M. *Nature* **1999**, 402, 693.
- (12) Ishihama, Y. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 73.
- (13) Fentem, J. H. *Hum. Exp. Toxicol.* **1994**, 13, 445.
- (14) Jiménez, J.; González, N.; Fernández, M.; Elvira, C.; López, A.; San Román, J. *Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona-ina*, 2008.



# CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Como se ha comentado en un apartado previo, esta Tesis Doctoral se basa en un planteamiento multidisciplinar cuyo objetivo primordial es solucionar o, al menos, minimizar los aspectos negativos del uso de vectores virales en terapia génica y, en la medida de lo posible, buscar nuevas alternativas no virales con prestaciones mejoradas (altos niveles de transfección celular combinados con bajas tasas de citotoxicidad) con respecto a los vectores virales.

Precisamente, esta búsqueda constituye el primero de los tres objetivos específicos en los que se puede desglosar el objetivo general antes mencionado. Este reto constituye, de hecho, la línea central del grupo de investigación al que pertenezco, y está dirigido al diseño, síntesis y caracterización de distintos tipos de moléculas que, aunque tienen en común todas una matriz lipídica, presentan estructuras globales muy variadas, como se verá en este capítulo, desde los lípidos gemini catiónicos más convencionales (GCLs), a las ciclodextrinas polianfílicas (paCDs), pasando por lípidos gemini que incorporan restos de aminoácido en su estructura o los más novedosos lípidos gemini-bolanfílicos (GBAs). A cada una de estas categorías se les va a dedicar un subapartado, dentro del presente apartado.

Íntimamente ligado a este primer objetivo, se encuentra el que se ha numerado como tercero al comienzo de esta memoria, dirigido a la evaluación de la corona de proteínas adherida al complejo vector-ácido nucleico cuando éste entra en contacto con los fluidos biológicos (como el suero humano), y su trascendencia en el proceso de transfección celular, aspecto de crucial importancia para los estudios *in vivo*, y, finalmente, en los ensayos clínicos. Se presenta en este apartado los resultados de este estudio para los vectores que mejores prestaciones bioquímicas han arrojado, las paCDs.

Paralelamente a esta línea de investigación, esta Tesis Doctoral supone el nacimiento de otra línea, dirigida al estudio del fenómeno del *silenciamiento génico* (*gene silencing*), como alternativa a la transfección de plásmidos de DNA. Como se ha comentado con anterioridad, el objetivo en este caso no es reemplazar secuencias defectuosas de DNA, responsables de la enfermedad, sino bloquearla o silenciarla.

El presente apartado está organizado, por tanto, en dos grandes bloques: uno dirigido a la transfección de plásmidos de DNA mediante distintos tipos de vectores no virales, y otro enfocado al silenciamiento génico.

## 5.1. TRANSFECCIÓN DE pDNA MEDIANTE VECTORES GÉNICOS NO VIRALES

### 5.1.1. Vectores lipídicos

La información de que se dispone en la literatura acerca del fenómeno de compactación lipídica del DNA, pone de manifiesto que la formación de los lipoplejos (complejo formado por sistemas lipídicos y el ácido nucleico) constituye un fenómeno de origen tanto termodinámico como cinético que da lugar a una gran distribución de formas y tamaños. Se trata de una interacción esencialmente electrostática entrópicamente dirigida, es decir, el incremento entrópico originado por la liberación de contraiones por ambas especies es la fuerza conductora de la asociación DNA-liposoma (condensación de Manning). Así, la atracción electrostática entre ambos da como resultado un agregado mesoscópico cuya estabilidad y cinética de agregación dependerán, entre otros parámetros, de la composición del liposoma, composición del lipoplejo, carga neta del mismo, fuerza iónica del medio, etc.

En el caso del DNA, parte de sus cargas negativas (grupos fosfatos) se encuentran neutralizadas por contraiones ( $\text{Na}^+$ ), de modo que cuando se añaden lípidos catiónicos, sus grupos cargados positivamente tienden a neutralizar por completo la carga del DNA. Para ello, los lípidos catiónicos de los liposomas, no sólo neutralizan los grupos fosfatos del DNA que quedaban libres, sino que además reemplazan a una parte de los contraiones que inicialmente neutralizaban la mayor parte de la carga del DNA. Paralelamente, los contraiones de los lípidos de los liposomas, también son reemplazados por las cargas del DNA, de manera que la expulsión de los respectivos contraiones da origen a la formación del lipoplejo resultante. Los contraiones ( $\text{Na}^+$ ) se hallan inicialmente próximos a las cargas de los fosfolípidos del DNA, de modo que para que el complejo se pueda formar, es necesario que el sistema experimente un proceso de inversión de carga, ya sea del liposoma o del DNA. Este fenómeno, también conocido como efecto de sobrecarga, consiste en la capacidad de un coloide cargado de atraer contraiones hasta el punto de que la carga neta del sistema sea de signo contrario a la que el coloide poseía originalmente.

Por consiguiente, es crucial analizar y comprender el balance de cargas y la interacción electrostática que dan origen a la formación del lipoplejo. De hecho, la caracterización electroquímica de los lipoplejos constituye el punto de arranque sobre el que se asienta el conjunto de estudios, tanto biofísicos, como bioquímicos. Como se ha mencionado anteriormente, en la formación del lipoplejo se produce un balance entre las cargas positivas del lípido catiónico y las negativas del DNA, y por ello, propiedades electroquímicas, como la movilidad electroforética y las que de ella derivan, como el potencial zeta,  $\zeta$ , o la densidad de carga superficial,  $\sigma$ , son las que pueden aportar la información más completa del citado proceso.

Se sabe que la composición, tanto del liposoma catiónico como del lipoplejo, son factores que tienen una gran influencia en su comportamiento, características y estructura, y, por consiguiente, son determinantes en sus prestaciones finales

como vectores génicos. La composición del liposoma se expresa normalmente en términos de su fracción molar,  $\alpha$ , mientras que para la composición del lipoplejo se suelen utilizar en la bibliografía dos parámetros adimensionales, la relación de masas ( $m_L / m_{DNA}$ ) o su relación de cargas efectivas,  $\rho_{eff}$ , que nos informa del cociente entre las cargas positivas efectivas, aportadas por el vector lipídico catiónico, y las cargas negativas efectivas, aportadas por los grupos fosfato del DNA. Estas magnitudes están relacionadas a través de las siguientes ecuaciones:

$$\frac{m_L}{m_{DNA}} = \frac{m_{L^+} + m_{L^0}}{m_{DNA}} \quad (5.1)$$

$$\alpha = \frac{m_{L^+} / M_{L^+}}{(m_{L^+} / M_{L^+}) + (m_{L^0} / M_{L^0})} \quad (5.2)$$

$$\rho_{eff} = \frac{n^+}{n^-} = \frac{q_{eff,L^+}^+ m_{L^+} / M_{L^+}}{q_{eff,DNA}^- m_{DNA} / \overline{M}_{bp}} \quad (5.3)$$

en las que  $m_{L^+}$  y  $m_{L^0}$  son las masas de lípido catiónico y lípido neutro respectivamente ( $m_L = m_{L^+} + m_{L^0}$ ) y  $m_{DNA}$  es la masa de DNA;  $M_{L^+}$  y  $M_{L^0}$  son sus masas molares;  $n^+$  y  $n^-$  son el número de moles de cargas positivas y negativas;  $q_{eff,L^+}^+$  y  $q_{eff,pDNA}^-$  son las cargas efectivas de lípido catiónico y de DNA (por par de bases, en adelante bp); y  $\overline{M}_{bp}$  es la masa molar promedio de DNA por bp.

La composición del lipoplejo a la que el número de cargas positivas aportadas por el lípido catiónico es igual al número de cargas negativas aportadas por los grupos fosfato del DNA ( $\rho_{eff} = 1$ ) se conoce como *relación de electroneutralidad o isoneutralidad*,  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$ , y es característica de cada sistema. Conocer la composición del complejo para la cual se da la electroneutralidad es importante porque para relaciones mayores, i.e.  $\rho_{eff} > 1$  y/o  $(m_L / m_{DNA}) > (m_L / m_{DNA})_\Phi$ , los lipoplejos no sólo protegen el DNA, sino que facilitan su transfección a las células. Así, los lipoplejos (o CDplejos) que presenten una carga superficial neta positiva pueden interaccionar de manera más eficiente con la membrana celular, cargada negativamente. Por tanto, a partir del valor de la electroneutralidad, los lipoplejos se convierten en vectores génicos potencialmente aceptables, es decir, la electroneutralidad marca un límite inferior a considerar en los siguientes estudios.

El valor de la electroneutralidad puede ser determinado experimentalmente, predicho teóricamente, o estimado a partir de la siguiente ecuación (5.4), que resulta de combinar las ecuaciones 5.1-5.3:



$$\left( \frac{m_L}{m_{DNA}} \right)_\Phi = \frac{q_{eff,DNA}^- [\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}]}{q_{eff,L}^+ \alpha M_{bp}} \quad (5.4)$$

Desde el punto de vista experimental, las medidas de potencial zeta,  $\zeta$ , en función de  $(m_L / m_{DNA})$ , ajustadas a una curva sigmoideal, permiten obtener con precisión el valor de  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  como el valor de  $(m_L / m_{DNA})$  para el que se observa la inversión de signo del potencial zeta, es decir, el valor de  $(m_L / m_{DNA})$  para el que el potencial zeta se anula. Esta inversión de potencial revela que la interacción liposoma mixto-DNA ocurre de manera superficial y electrostática y, tal como se ha comentado anteriormente, el proceso está dirigido entrópicamente debido a la liberación de contraiones del lípido catiónico y  $Na^+$  del biopolímero. Evidentemente, tanto la movilidad electroforética,  $\mu_e$ , como la densidad de carga superficial,  $\sigma_e$ , presentan hábitos similares y conducen al mismo valor de  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$ . De las tres propiedades, la única medida experimental directa, que no está afectada por ninguna aproximación, es la movilidad electroforética,  $\mu_e$ . De hecho, es la propiedad preferida por los físicos para estudiar este proceso de inversión de carga; los químicos, en cambio, suelen trabajar con el potencial zeta, asumiendo que se cumple la aproximación de Smoluchowski (partículas relativamente grandes, con tamaños claramente superiores al espesor de la atmósfera iónica) para obtener el potencial zeta a partir de movilidad electroforética (ecuación de Henry).

Trabajos publicados en la bibliografía por distintos grupos de investigación, incluido el nuestro, han confirmado que el DNA lineal, como el del timo de ternera (ctDNA) o el del esperma de salmón, ofrecen toda su carga negativa accesible al lípido catiónico, y por tanto,  $q_{lineal\ DNA}^- = -2$  (por bp). Sin embargo, experimentos recientes de nuestro grupo<sup>1-3</sup> han demostrado que a pH fisiológico y dependiendo de la fuerza iónica, el plásmido DNA (pDNA) permanece en una conformación superenrollada, de modo que ofrece una carga negativa efectiva menor que su carga nominal, es decir,  $q_{eff,pDNA}^- < -2/bp$ . Una evidencia experimental indiscutible de este hecho es que para un mismo sistema lipídico mixto, el valor experimental de  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  es menor en presencia de pDNA que con ctDNA, lo que significa que para alcanzar la electroneutralidad del lipoplejo (y por tanto para formar el lipoplejo con carga positiva) es necesaria una menor cantidad de liposoma mixto catiónico cuando éste compacta el pDNA. Esta evidencia se ha observado en todos los sistemas estudiados hasta el momento.<sup>2,3</sup>

Por otra parte, los resultados obtenidos en los últimos años apuntan a que las cabezas polares de los lípidos catiónicos utilizados para preparar los lipoplejos poseen una carga efectiva que en algunos casos coincide con su carga nominal (+1 para los lípidos monovalentes CL y +2 para los divalentes, GCL), pero que en la mayoría de los casos es menor.<sup>3-5</sup>

Por tanto resulta evidente que cualquier estudio biofísico o bioquímico de lipoplejos debe empezar por la determinación de las cargas reales o efectivas del

lípidio catiónico,  $q_{eff,L^+}^+$ , y el plásmido DNA,  $q_{eff,pDNA}^-$ , cuando forman el lipoplejo. Nótese que el lípidio zwitteriónico (DOPE), generalmente presente en el sistema lipídico mixto para favorecer el proceso de internalización celular por su carácter fusogénico, posee carga neta nula a pH fisiológico, por lo que aporta masa, pero no carga. Nuestro grupo de investigación diseñó y publicó<sup>3</sup> un protocolo experimental para la determinación de las cargas efectivas, que, esencialmente, consta de los siguientes pasos:

i) determinación de la carga efectiva del lípidio catiónico,  $q_{eff,L^+}^+$ , para un cierto valor de la fracción molar,  $\alpha$ , a partir de la ecuación 5.4, y haciendo uso del valor de  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  determinado experimentalmente con el potencial zeta para el lipoplejo que se esté caracterizando, CL/DOPE-ctDNA (en el que  $q_{lineal\ DNA}^- = q_{ctDNA}^- = -2/\text{bp}$ ).

$$q_{eff,L^+}^+ = \frac{q_{lineal\ DNA}^- [\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}]}{(m_L / m_{DNA})_\Phi \alpha M_{bp}} \quad (5.5)$$

ii) determinación de la carga efectiva del plásmido (por par de bases),  $q_{pDNA}^-$ , a partir del mismo tipo de medidas de potencial zeta, determinando  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  del lipoplejo CL/DOPE-pDNA en las mismas condiciones, pero ahora utilizando el plásmido circular DNA superenrollado, en vez del DNA lineal, y haciendo uso de la ecuación:

$$q_{eff,pDNA}^- = \left( \frac{m_L}{m_D} \right)_\Phi \left( \frac{q_{eff,L^+}^+ \alpha \overline{M_{bp}}}{[\alpha M_{L^+} + (1-\alpha) M_{L^0}]} \right) \quad (5.6)$$

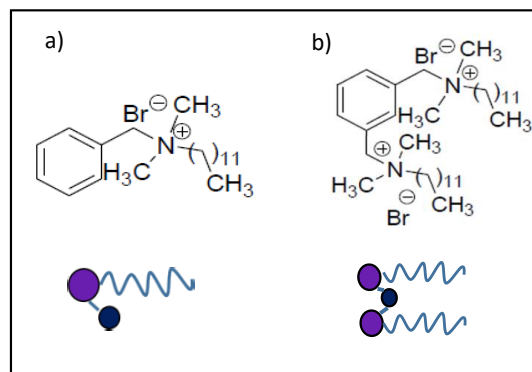
iii) cálculo de  $\rho_{eff}$ , a partir de la ecuación 5.3, conociendo ya las cargas efectivas de lípidio y DNA.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para todos los sistemas vector lipídico catiónico-pDNA estudiados en esta Tesis Doctoral. El protocolo arriba resumido es el que se ha utilizado para determinar las cargas efectivas de los vectores catiónicos y de los plásmidos utilizados.

- **Vector lipídico gemini con espaciador aromático (12PH12) y su homólogo monocabeza/monocadena (12PH)**

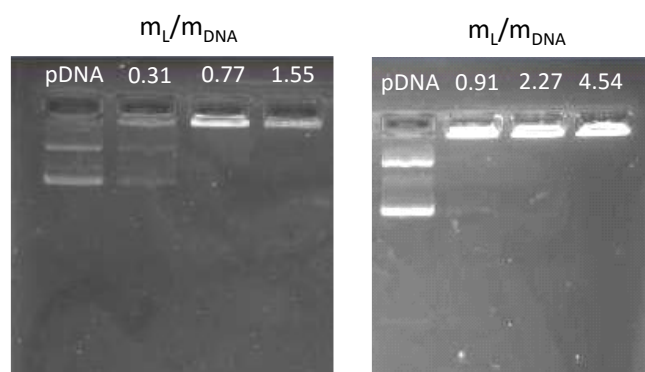
Los lípidos catiónicos estudiados en este apartado son tanto un lípidio catiónico convencional (una cabeza y una cola), 12PH, como su correspondiente derivado gemini (dos cabezas con dos colas y un espaciador de tipo aromático), 12PH12. En este caso, las colas hidrofóbicas están formadas por 12 C, mientras que las cabezas catiónicas están constituidas por grupos amino cuaternario unidas por un anillo aromático (véase Figura 5.1).

Con el objetivo de obtener información sobre la relación estructura-actividad (SAR), se han evaluado las características fisicoquímicas de los lipoplejos formados por 12PH12/DOPE-pDNA, que contienen el lípido gemini (12PH12), y se ha comparado con las obtenidas para el lipoplejo 12PH/DOPE-pDNA, que contiene su correspondiente molécula de una cadena (12PH)



**Figura 5.1.** Dibujo esquemático de los lípidos a) 12PH y b) 12PH12

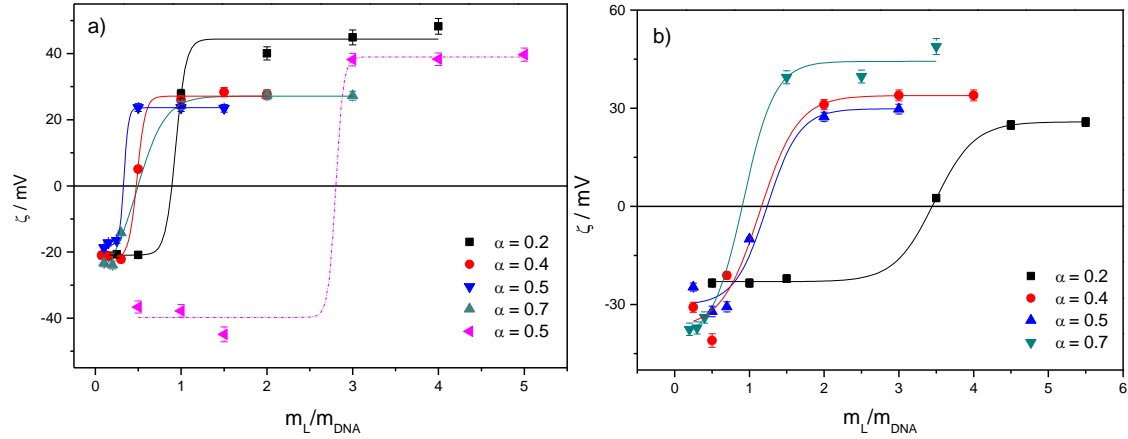
En primer lugar, se ha determinado el grado de compactación del pDNA por los liposomas catiónicos mediante electroforesis en gel de agarosa, que permite estimar, de manera aproximada, la relación de masas  $m_L / m_{DNA}$  a partir de la cual se compacta el plásmido. En la Figura 5.2 se muestran los resultados a tres relaciones de masas diferentes y a una fracción molar  $\alpha = 0,2$  de lípido mixto para ambos lipoplejos, 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA. Las bandas fluorescentes, correspondientes a la forma enrollada y superenrollada del plásmido, desaparecen a lo largo de los carriles, así como con el incremento de la relación  $m_L / m_{DNA}$ . La relación de masas a la que se compacta todo el pDNA viene dada por esta pérdida de fluorescencia, estando ya compactado para unos valores de  $m_L / m_{DNA}$  igual a 0,77 y 0,9 para el 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA respectivamente.



**Figura 5.2.** Electroforesis en gel de agarosa de los lipoplejos: a) 12PH12/DOPE-pDNA, y b) 12PH/DOPE-pDNA, a varias relaciones de masas  $m_L / m_{DNA}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, la importancia de obtener lipoplejos con carga neta positiva, implica determinar los valores de electroneutralidad y, a partir de ellos, las cargas efectivas tanto del lípido catiónico,  $q_L^+$ , como del

plásmido  $q_{pDNA}^-$ . Esto se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 5.1.1. En la Figura 5.3a, se observa un perfil sigmoidal característico de potencial zeta frente a  $m_L/m_{DNA}$  para 12PH12/DOPE-ctDNA a  $\alpha = 0,5$ . Para este lipoplejo, el procedimiento previamente descrito ha permitido obtener el valor de electroneutralidad  $(m_L/m_{DNA})_\Phi$  y la carga efectiva del lípido 12PH12, ( $q_{eff,12PH12}^+ = 1,6 \pm 0,1$ ), siendo ésta un 20% más baja que su carga nominal (-2 bp). Para la molécula 12PH, y debido a su naturaleza monovalente, se ha asumido una carga de  $q_{12PH}^+ = 1$ .



**Figura 5.3.** Gráficas de potencial zeta frente a  $m_L/m_{DNA}$  para los lipoplejos: a) 12PH12/DOPE con ctDNA (línea punteada) y con pDNA (líneas sólidas); b) 12PH/DOPE con pDNA

La Figura 5.3 muestra los valores de potencial zeta frente a  $m_L/m_{DNA}$  a diferentes relaciones molares  $\alpha = 0,2; 0,4; 0,5$  y  $0,7$ . Se han obtenido las relaciones de electroneutralidad,  $(m_L/m_{DNA})_\Phi$ , para los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA a las diferentes fracciones molares,  $\alpha$ , y, a partir de ellos, la carga efectiva del plásmido. Estos valores, recogidos en la Tabla 5.1, muestran que la carga efectiva del plásmido,  $q_{eff,pDNA}^-$ , en los lipoplejos formados por 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA es, respectivamente, un 15-20% y un 40-42% de su carga nominal (-2/bp). El hecho de que la carga real del pDNA sea menor, es beneficioso para obtener un lipoplejo positivo con una menor cantidad de vector catiónico. Una vez determinada la carga efectiva de los GCL y del pDNA, es posible calcular la relación de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , del lipoplejo según la ecuación 5.3 del protocolo previamente descrito.

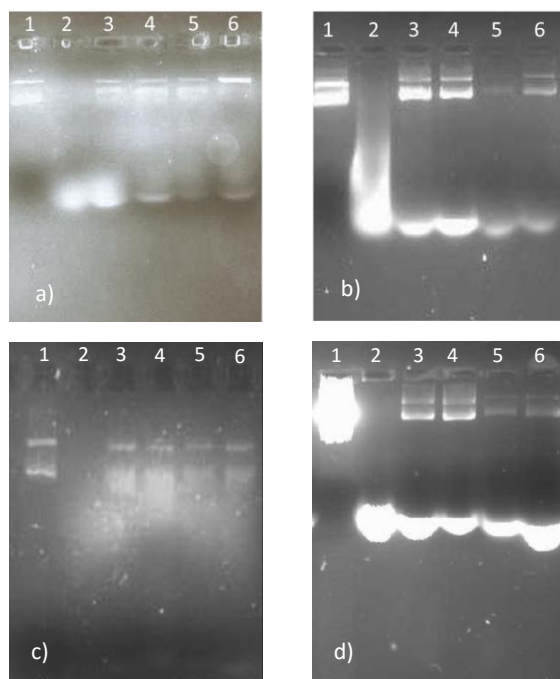
**Tabla 5.1.** Relaciones de electroneutralidad  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$ , y carga efectiva del pDNA (pEGFP-C3).

Lipoplejos		$\alpha = 0,2$	$\alpha = 0,4$	$\alpha = 0,5$	$\alpha = 0,7$
12PH12/DOPE-pDNA	$(m_L / m_{DNA})_\Phi$	0,13	0,18	0,16	0,31
12PH/DOPE-pDNA	$(m_L / m_{DNA})_\Phi$	0,45	0,33	0,41	0,50
12PH12/DOPE-pDNA	$q_{\text{eff,pDNA}}^- / \text{bp}$	-0,23	-0,27	-0,24	-0,47
12PH/DOPE-pDNA	$q_{\text{eff,pDNA}}^- / \text{bp}$	-0,77	-0,57	-0,70	-0,85

Errores menores a un 5%

La pendiente de la Figura 5.3 es indicativa de las interacciones electrostáticas en el complejo constituido por el vector génico y el DNA. Así, las curvas resultantes del ajuste de los puntos, a cada  $\alpha$ , indican que las pendientes siguen el orden 12PH12/DOPE-pDNA > 12PH/DOPE-pDNA, lo que sugiere que la compactación, fuerza y estabilidad de los lipoplejos debería seguir una tendencia similar.

El DNA es fácilmente degradado por las DNAsas que constituyen el suero humano, siendo esta una de las razones por las que algunos vectores no son eficaces en experimentos *in vivo*. Por ello es de gran importancia evaluar la capacidad del vector para proteger el plásmido frente a la degradación de la DNasa I. Para confirmar que los vectores utilizados en este trabajo protegen el ácido nucleico, los experimentos se han llevado a cabo con dos plásmidos diferentes, uno que codifica para la proteína GFP, pEGFP-C3, y el otro que codifica para la luciferasa (pCMV-Luc). La Figura 5.4 representa los experimentos en gel de agarosa con ambos plásmidos a dos fracciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ), y a dos relaciones de carga ( $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $10$ ) de los lipoplejos. El plásmido de DNA desnudo, digerido rápidamente por las DNasa I, se utiliza como control (carriles 2 de ambos geles). Las bandas del DNA en los carriles 3-6 de ambos geles, indican la presencia de un DNA intacto, confirmando que los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA compactan el plásmido, impidiendo su contacto con la DNasa I. Esta eficaz protección del pDNA frente a la degradación, señala a estos vectores como potenciales transportadores no virales de ácidos nucleicos.



**Figura 5.4.** Electroforesis en gel de agarosa para la protección del plásmido pEGFP-C3 con los lípidos mixtos 12PH12/DOPE (a), and 12PH/DOPE (c); y para el plásmido pCMV-Luc con el lípido mixto 12PH12/DOPE (b) y 12PH/DOPE (d). Carril 1, pDNA; carril 2, pDNA-DNAsas. El resto de carriles a diferentes fracciones molares;  $\alpha = 0,2$ , carriles 3-4, y  $\alpha = 0,5$ , carriles 5-6 y a diferentes relaciones de carga efectiva  $\rho_{eff} = 4$ , carriles 3 y 5 y  $\rho_{eff} = 10$  carriles 4 y 6.

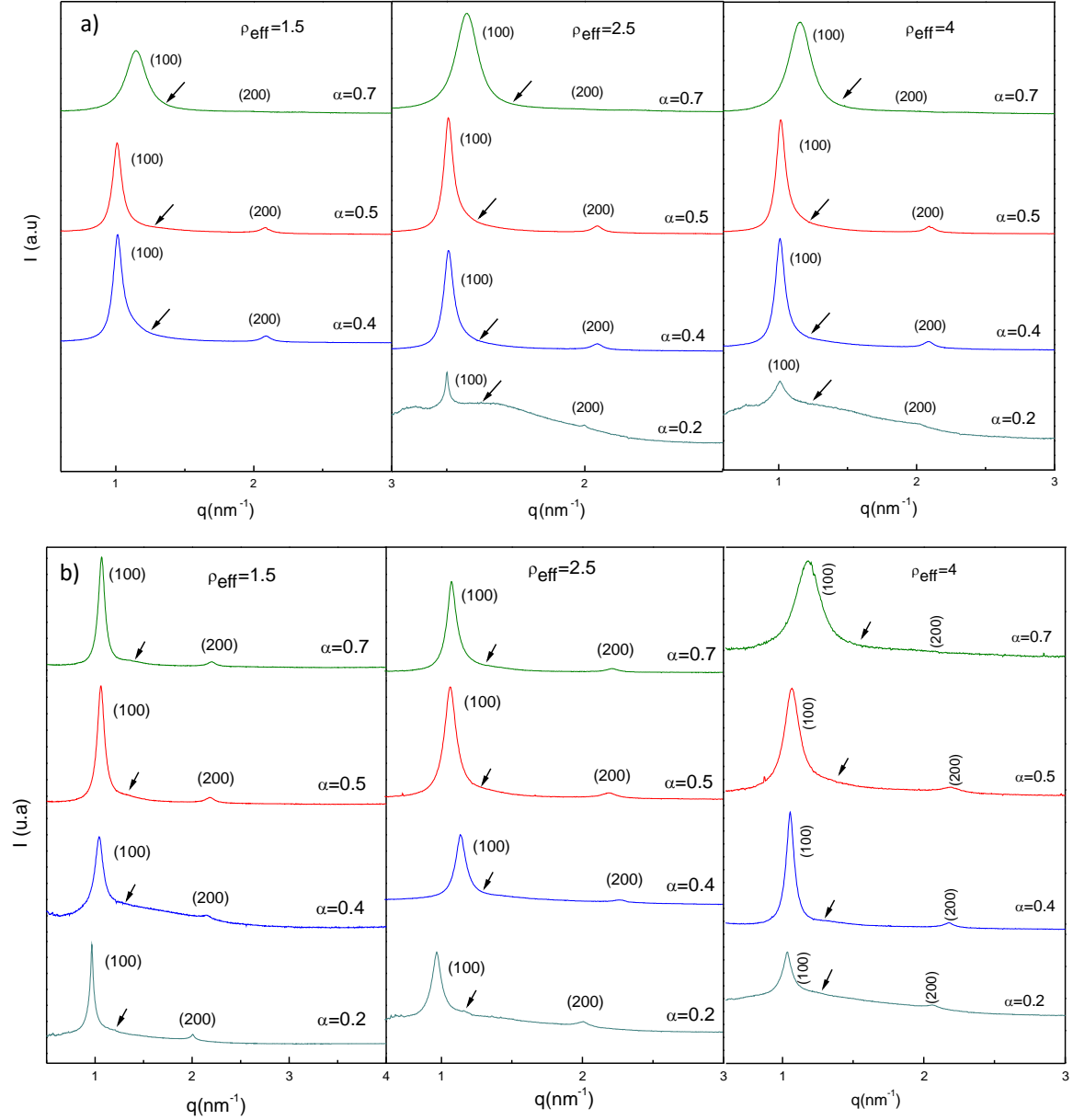
La caracterización estructural se ha hecho mediante DLS, SAXS y crio-TEM. En la Tabla 5.2 se recoge el tamaño de partícula obtenido por DLS a varias fracciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ) y a dos relaciones de carga efectiva ( $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ ), para los dos lipoplejos con cada plásmido. Todos los nanoagregados presentan tamaños de partícula entre 130 y 200 nm, con bajos valores de polidispersidad (PDI). Se acepta que un tamaño  $< 200$  nm favorece los mecanismos de endocitosis para atravesar la membrana celular, aspecto de gran trascendencia para que estos sistemas sean adecuados para transfectar los ácidos nucleicos en procesos biológicos.<sup>6,7</sup>

**Tabla 5.2.** Valores de tamaños ( $D_h$ ) y polidispersidades (PDI) de la población de lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA formados con los plásmidos pEGFP-C3 y pCMV-Luc, a varias relaciones de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) y a dos composiciones molares: (a)  $\alpha = 0,2$ , and (b)  $\alpha = 0,5$ .

$\alpha = 0,2$	$\rho_{eff} = 4$		$\rho_{eff} = 10$	
	$D_h$ (nm)	PDI	$D_h$ (nm)	PDI
12PH12/DOPE- pEGFP-C3	149	0,22	142	0,17
12PH/DOPE-pEGFP-C3	160	0,50	199	0,22
12PH12/DOPE-pCMV-Luc	188	0,16	250	0,26
12PH/DOPE-pCMV-Luc	212	0,28	186	0,12
$\alpha = 0,5$				
12PH12/DOPE- pEGFP-C3	173	0,13	155	0,29
12PH/DOPE-pEGFP-C3	368	0,19	238	0,22
12PH12/DOPE-pCMV-Luc	146	0,11	129	0,14
12PH/DOPE-pCMV-Luc	175	0,19	300	0,40

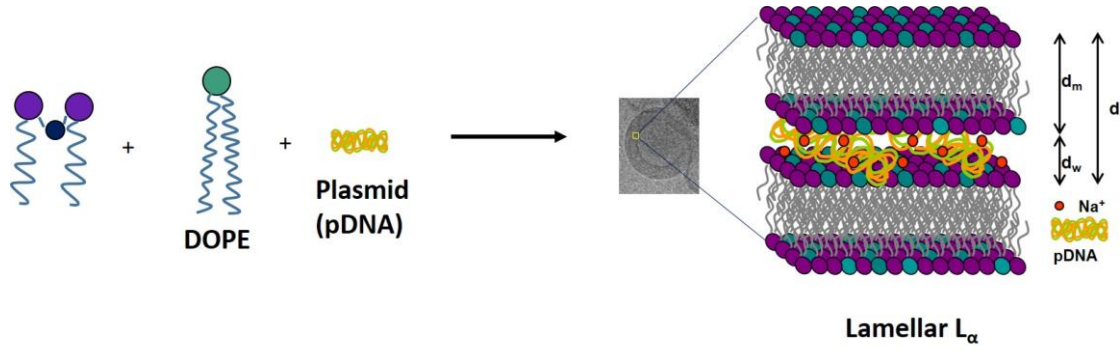
Errores menores a un 5%

Los experimentos de SAXS se han llevado a cabo para ambos lipoplejos (con el plásmido pEGFP-C3), a varias fracciones molares,  $\alpha$ , de lípido mixto y a relación de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) del lipoplejo. La Figura 5.5 recoge los difractogramas ( $I$  frente a factor  $q$ ), donde los máximos de difracción observados se pueden indexar a una estructura lamelar,  $L_\alpha$ , con una distancia interlamelar directamente relacionada con el factor  $q$ , ( $2\pi n/q_{hkl}$ ), estando los índices de Miller incluidos en la Figura 5.5.



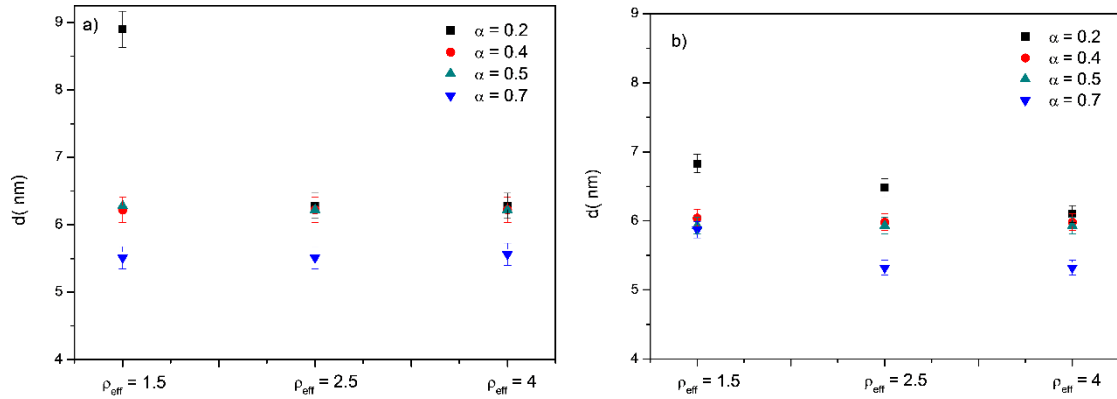
**Figura 5.5.** Difractogramas de SAXS: (a) 12PH12/DOPE-pDNA, and (b) 12PH/DOPE-pDNA, a varias fracciones molares de lípido mixto ( $\alpha = 0,2; 0,4; 0,5$  y  $0,7$ ) de lípido mixto y carga efectiva de lipoplejo ( $\rho_{eff} = 1,5; 2,5$  y  $4$ ).

Esta estructura lamelar (Figura 5.6) puede ser representada como bicapas alternas de lípido mixto y plásmido, donde  $d = d_m + d_w$ , siendo  $d_m$  y  $d_w$  el espesor de la bicapa de lípido mixto y la monocapa acuosa.



**Figura 5.6.** Imagen esquemática de una estructura lamelar  $L_{\alpha}$

Los valores de la periodicidad interlamelar,  $d$ , recogidos en la Figura 5.7, se encuentran en el intervalo entre 5,5 y 7 nm, indicando para ambos lipoplejos: i), a  $\alpha$  constante, permanece constante o disminuye ligeramente con la  $\rho_{eff}$ , y ii) a  $\rho_{eff}$  constante, decrece ligeramente con  $\alpha$ . Estos valores de  $d$ , junto con un valor de  $d_m \sim 4,5$  nm para bicapa de lípidos 12PH12/DOPE y 12PH/DOPE,<sup>8</sup> permite estimar un valor de  $d_w \sim 1,8-2,5$  nm, valor suficiente para alojar el plásmido DNA.

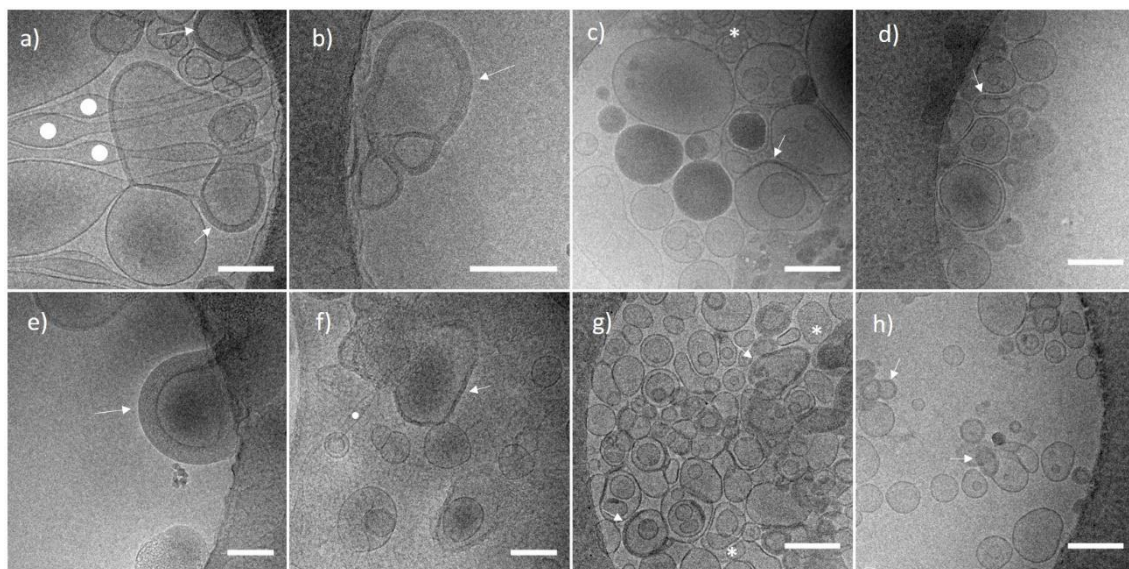


**Figura 5.7.** Representación de la distancia interlamelar,  $d$ , para los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA (a), y 12PH/DOPE-pDNA (b) en función de la relación de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) y  $\alpha = 0,2; 0,4; 0,5$  y  $0,7$ .

Asimismo, crio-TEM es una poderosa herramienta que, junto con SAXS, permite obtener información estructural. La Figura 5.8 engloba las micrografías para el 12PH12/DOPE-pDNA (a-d) y 12PH/DOPE-pDNA (e-h) con el plásmido pEGFP-C3, a  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , ambas a una carga efectiva  $\rho_{eff} = 4$ . Estas imágenes revelan la presencia de liposomas mixtos sin DNA (señalado con asteriscos). Adicionalmente, se observan dos estructuras diferentes; i) en concordancia con los experimentos de SAXS, se encuentra una estructura lamelar (flechas blancas), y ii) a  $\alpha = 0,2$  se observan estructuras tipo *ribbon* (círculos blancos) para ambos sistemas 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA. Las estructuras tipo *ribbon* (*twisted* y *coiled*) están recogidas en la literatura para lípidos y lipoplejos.<sup>9-12</sup> Principalmente, la unidad fundamental de la estructura

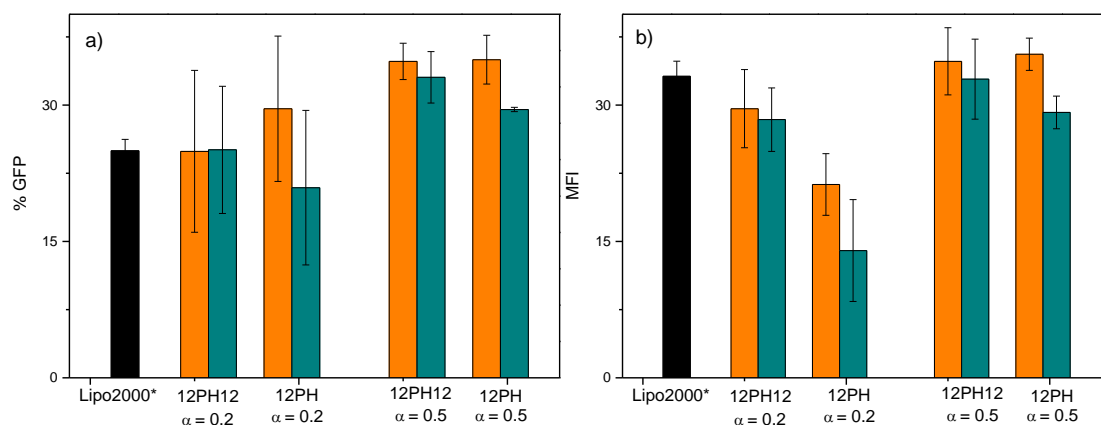


tipo *ribbon* encontrada en este trabajo consiste en una serie de monocapas con pDNA súper enrollado y compactado entre ellas.<sup>12</sup>



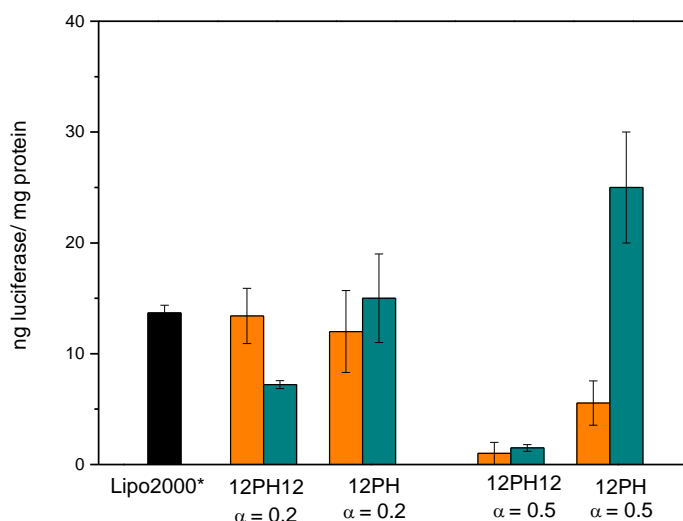
**Figura 5.8.** Micrografías de crio-TEM para los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA a  $\rho_{eff} = 4$  y composiciones molares: 12PH12/DOPE-pDNA  $\alpha = 0,2$  (a-b), y  $\alpha = 0,5$  (c-d), y para los lipoplejos 12PH/DOPE-pDNA:  $\alpha = 0,2$  (e-f) y  $\alpha = 0,5$  (g-h). Barra de escala: 200 nm.

Puesto que la caracterización físicoquímica ha revelado que ambos lipoplejos son capaces de proteger el DNA de la degradación de la DNAsa I presentes en el suero humano, y compactarlo formando agregados con estructuras potencialmente apropiadas para transfectar el ácido nucleico a las células, se ha evaluado su eficacia y biocompatibilidad como vector en experimentos *in vitro*. Así, la eficacia de transfección, TE, se ha probado en la línea celular COS-7 en presencia de un 10% de suero, a  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , cada una de ellas a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ . En este estudio, la Lipofectamina 2000 (Lipo2000\*) se ha usado como control positivo. En estos experimentos se han usado los dos tipos de plásmido mencionados anteriormente, pEGFP-C3 y pCMV-Luc. En la Figura 5.9, aparecen recogidos los resultados de TE, evaluados mediante FACS y representados en términos del % de población de células que expresan GFP, (%GFP) y de la intensidad media de fluorescencia (MFI). Los resultados muestran que ambos lípidos mixtos, 12PH12/DOPE y 12PH/DOPE, son capaces de transfectar el plásmido pEGFP-C3. En términos de % de GFP y MFI, la eficacia de transfección es mejor a composiciones moderadas ( $\alpha = 0,5$ ), siendo las formulaciones óptimas, en términos de GFP, algo mejores que la Lipo2000\*. El mejor resultado de eficacia de transfección a  $\alpha = 0,5$  respecto a  $0,2$  se puede atribuir a una mayor cantidad de lípido catiónico a composiciones moderadas de lípido mixto. Cabe mencionar que no hay diferencias significativas de TE a las distintas relaciones de carga efectivas, siendo similar la eficacia o incluso ligeramente mejor a relaciones de carga efectiva moderadas ( $\rho_{eff} = 4$ ).



**Figura 5.9.** Eficacia de transfección (%GFP y MFI) en células COS-7 a dos fracciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ) para los lipoplejos: 12PH12/DOPE-pEGFP y 12PH/DOPE-pEGFP. Los experimentos se han realizado con un 10% de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y verdes corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ , respectivamente.

La eficacia de transfección también se ha evaluado en términos de ng de luciferasa por mg de proteína en lipoplejos que contienen el plásmido pCMV-Luc (Figura 5.10).

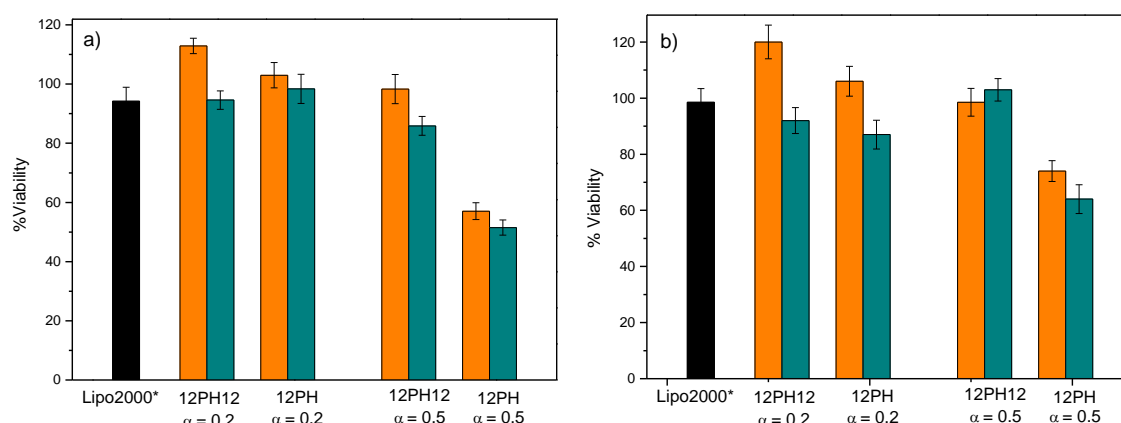


**Figura 5.10.** Eficacia de transfección en las células COS-7 a dos composiciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ) de los lipoplejos 12PH12/DOPE-pEGFP y 12PH/DOPE-pEGFP. Los experimentos se han realizado con un 10 % de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y verdes corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$  respectivamente.

Los valores obtenidos con las formulaciones de ambos lípidos mixtos 12PH12/DOPE y 12PH/DOPE son comparables a los obtenidos con la Lipo2000\* a  $\alpha = 0,2$ , y significativamente mejor para el lípido mixto 12PH/DOPE a  $\alpha = 0,5$  y  $\rho_{eff} = 10$ .

La biocompatibilidad de los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA formados con cada uno de los plásmidos, pEGFP-C3 y pCMV-Luc, se ha llevado a cabo mediante un ensayo de Alamar Blue en las células COS-7. Los resultados recogidos en la Figura 5.11 a varias fracciones molares,  $\alpha$ , y

relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff}$ , han sido también comparadas con el control positivo Lipo2000\*. La viabilidad celular es similar con los dos plásmidos usados y confirma que la toxicidad viene dada por el lípido catiónico. A  $\alpha = 0,2$ , todos los lipoplejos muestran una viabilidad por encima del 85%, lo cual es considerado un valor óptimo, siendo en algunos casos, incluso mejor que los obtenidos para el control positivo, mientras que a contenidos moderados de CL ( $\alpha = 0,5$ ), la viabilidad está en torno a un 60-80%, lo que puede considerarse una toxicidad baja.



**Figura 5.11.** Viabilidad celular de la línea COS-7 a dos fracciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ) en presencia de los lipoplejos 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA. Los plásmidos usados han sido a) pEGFP-C3 y b) pCMV-Luc. Los experimentos se han realizado con un 10% de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y verdes corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ , respectivamente.

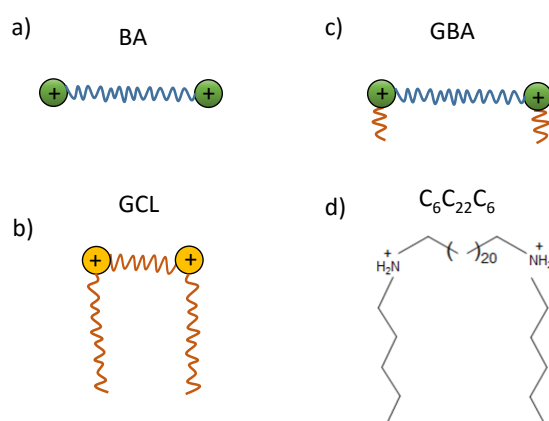
El análisis conjunto de los resultados de eficacia de transfección y viabilidad celular indica que los sistemas 12PH12/DOPE-pDNA y 12PH/DOPE-pDNA muestran sus mejores prestaciones a  $\alpha = 0,2$  y  $\rho_{eff} = 4$ , siendo comparables, y en algunos casos incluso mejor, a la Lipo2000\*.

Globalmente, se podría concluir que tanto el lípido monovalente (12PH) como su correspondiente gemini (12PH12) son capaces de compactar el pDNA y protegerlo de la degradación de la DNasa I. Asimismo, se ha encontrado la presencia de dos estructuras; i) una fase lamelar, a las dos composiciones de lípido mixto estudiadas ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ), y ii) una estructura tipo *ribbon* a bajas composiciones molares ( $\alpha = 0,2$ ). Tanto la eficacia de transfección como la viabilidad celular determinada con dos tipos de plásmidos (pEGFP-C3 y pCMV-Luc), confirman la capacidad de las formulaciones propuestas para transportar material genético, con eficacia y biocompatibilidad comparable o incluso mejor que la Lipo2000\*. Por tanto, aunque en la literatura, debido a la alta variedad de modificaciones que mejoran la actividad biológica de los lipoplejos, los mayores esfuerzos se han centrado en los GCLs, el lípido de una cadena con un grupo catiónico amonio unido a un anillo aromático, analizado en este estudio, también exhibe una buena actividad biológica, comparable a su correspondiente GCL, como también se ha encontrado en estudios con otros lípidos catiónicos.<sup>13,14</sup> Ambas formulaciones presentan características adecuadas para ser evaluadas en posibles futuros estudios *in vivo*.

### • Vectores lipídicos gemini-bolanfílicos (GBAs)

Junto con los lípidos gemini (GCLs), anteriormente comentados, existe otra clase de lípidos con potencial para ser utilizados como vectores génicos; son los conocidos como lípidos bolaformes (*“bolaform lipids”*) o bolanfílicos (BAs), caracterizados por tener en su estructura dos cabezas hifrofílicas (iónicas o no iónicas) separadas por uno, dos, o tres espaciadores hidrofóbicos largos, normalmente cadenas alquílicas de 22 a 32 átomos de C. Las dos cabezas polares pueden ser, además, iguales o diferentes, originando nanoagregados simétricos o asimétricos respectivamente. El término “bolaforme” o “bolanfílico”, acuñado originalmente por Fuoss y Edelson, tiene su origen en la palabra inglesa “bola”, que se refiere a un arma constituida por una cuerda o cordel largo en cuyos extremos se disponen dos bolas metálicas pesadas. Esta peculiar estructura provoca que, en términos generales, tiendan a autoagregarse formando membranas tipo monocapa, con menor permeabilidad, mayor rigidez y mejor durabilidad que las membranas tipo bicapa lipídica, formadas a partir de fosfolípidos y lípidos gemini. Dependiendo esencialmente de la longitud del espaciador, los lípidos BAs se autoagregan en forma de micelas (espaciador corto) o vesículas (espaciador largo), aunque en ambos casos mantienen su característica morfología de monocapa. Los BAs ya se han utilizado con éxito como vectores de fármacos,<sup>15-19</sup> y como vectores no virales de DNA y siRNA, cuando ambas cabezas (o al menos una de las dos) están cargadas positivamente. De hecho, se ha comprobado su capacidad para compactar los ácidos nucleicos, formando lo que se conoce como *bolaplejos* (complejos BA-DNA o BA-siRNA), protegerlos eficientemente de las DNAsas y RNAsas, internarse en la células por endocitosis y transfectarlas con buenos niveles de expresión proteica y bajas citotoxicidades.<sup>20-23</sup>

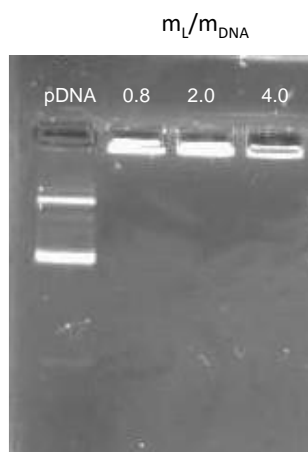
La Figura 5.12 muestra un esquema simplificado de un lípido bolanfílico (BA) en el que ambas cabezas son catiónicas, en comparación con la estructura característica de un lípido catiónico gemini (GCL), caracterizado por dos cabezas catiónicas unidas a sendas cadenas hidrofóbicas y conectadas entre sí por un espaciador más o menos largo, pero no tan largo como en los bolaformes.



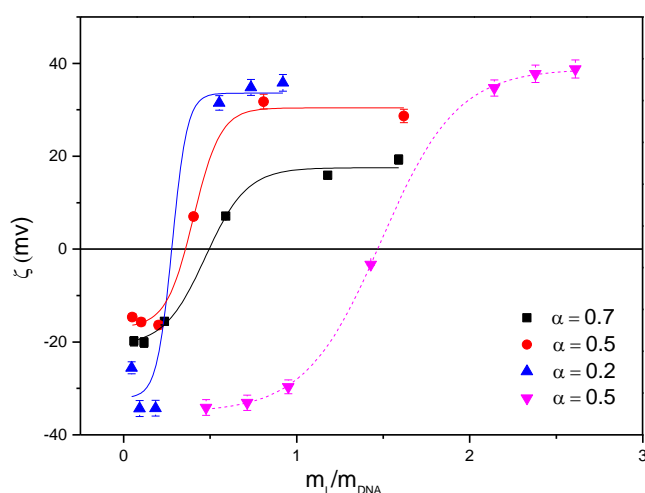
**Figura 5.12.** Esquema de la estructura de: a) lípido bolaforme (BA); b) lípido gemini (GCL); y c) lípido gemini bolaforme (GBA), como el utilizado en este trabajo. (d) estructura del lípido C<sub>6</sub>C<sub>22</sub>C<sub>6</sub>.

En esta Tesis se han evaluado las prestaciones como vector génico de un sistema mixto formado por el DOPE, lípido coadyuvante y fusogénico habitualmente utilizado, y un lípido gemini-bolanfilico (GBA), con una estructura híbrida entre la de un lípido gemini (GCL), en tanto en cuanto contiene dos cabezas catiónicas tipo amina secundarias unidas a sendas cadenas hidrofóbicas cortas de 6 átomos de C, y la de un bolanfilico (BA), en el sentido de que dichas cabezas catiónicas están conectadas por un espaciador largo de 22 átomos de C (véase estructura en Figura 5.12 c-d). Esta desproporción en la longitud de las cadenas hidrofóbicas (6C) con respecto a la del espaciador (22C), provoca que éste último adquiera potencialmente un papel protagonista en el proceso de autoagregación en el que se basa la formación posterior del lipoplejo cuando está presente el DNA. En particular, se ha utilizado en esta Tesis este vector lipídico (denominado  $C_6C_{22}C_6$ ) para compactar y transfectar dos plásmidos de DNA a células COS-7: uno que codifica a la GFP (pEGFP-C3) y otro que codifica a Luciferasa (pCMV-Luc).

A continuación se presenta la caracterización biofísica y bioquímica llevada a cabo. El estudio electroquímico del sistema  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE-pDNA, consistente en: i) electroforesis en gel de agarosa; ii) potencial zeta; y iii) geles de protección frente a la degradación de la DNasa I, se muestra recogido en las Figuras 5.13, 5.14 y 5.15, respectivamente. La Figura 5.13 evidencia que para una relación de masas  $m_L / m_{DNA} = 0,8$  a  $\alpha = 0,5$ , el pDNA ya está eficazmente compactado, y, por tanto, inmóvil en el pozo de partida del experimento de electroforesis en gel de agarosa. Este hecho indica que la electroneutralidad se alcanza a composiciones  $m_L / m_{DNA}$  inferiores a 0,8, para  $\alpha = 0,5$ . Precisamente, el experimento de potencial zeta (Figura 5.14) nos permite precisar la razón de electroneutralidad (ver Tabla 5.3), y, a partir de esta particular composición y aplicando el protocolo anteriormente descrito en esta memoria, determinar las cargas efectivas del lípido catiónico y del plásmido, que, en promedio, han resultado ser  $q_{eff, C_6C_{22}C_6}^+ = 1,4 \pm 0,1$  y  $q_{eff, pDNA}^- = 0,6 \pm 0,1$ . Es decir, el lípido catiónico y el plásmido ofrecen sólo el 70% y el 30% de sus carga nominales positiva y negativa, respectivamente, comportamiento, por otra parte, habitual en este tipo de sistemas. Es conocido (y ya ha sido comentado con anterioridad en esta tesis) que el superenrollamiento del plásmido en condiciones fisiológicas condiciona su capacidad para retener un tanto por ciento nada desdeñable de cationes  $Na^+$ , disminuyendo ostensiblemente su carácter aniónico. Este hecho, a la postre, puede resultar ventajoso para nuestros objetivos, ya que, cuanto menor sea el carácter aniónico del plásmido, menor será también la cantidad de vector catiónico necesario para compactarlo y generar una entidad netamente positiva (condición necesaria para atravesar la membrana celular), disminuyendo de esta forma también su citotoxicidad.



**Figura 5.13.** Electroforesis en gel de agarosa para el lipoplejo  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA a  $\alpha = 0,5$  y a distintas relaciones  $m_L / m_{DNA}$



**Figura 5.14.** Potencial zeta vs.  $m_L / m_{DNA}$  para los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA constituidos por ctDNA (línea punteada) y pDNA (líneas sólidas).

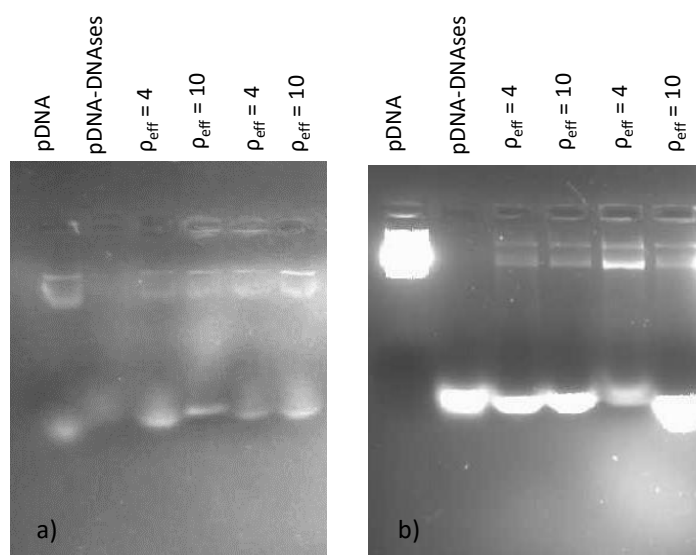
**Tabla 5.3.** Razón de electroneutralidad  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  y cargas efectivas del pDNA.

$\alpha$	0,2	0,5	0,7
$(m_L / m_{DNA})_\Phi$	0,28	0,35	0,49
$q_{\text{eff,pDNA}}^- / \text{bp}$	- 0,65	- 0,54	- 0,60

Errores inferiores a 5%

Para que un nanosistema pueda convertirse en un vector génico adecuado conviene que, además de compactar eficazmente el plásmido y generar una entidad netamente catiónica (aspectos ya confirmados con los experimentos previos de geles de agarosa y potencial zeta), sea capaz de protegerlo contra el ataque de las DNAsas presentes en el suero humano. Esta información es crucial cuando se pretende hacer estudios *in vivo*. Como puede verse en la Figura 5.15, donde se recogen los experimentos de protección frente a la DNasa I, el sistema coloidal mixto  $C_6C_{22}C_6/DOPE$  ejerce una eficiente protección sobre los dos plásmidos utilizados en este apartado, el que codifica a GFP (pEGFP-C3)

y el que lo hace a Luciferasa (pCMV-Luc). Así, el carril 1 (en el que corre el pDNA sólo) muestra las bandas fluorescentes características del EtBr intercalado en las dobles hélices del plásmido en sus formas enrollada y super-enrollada, mientras que en el carril 2 refleja el avance del plásmido libre (en ausencia de vector) tras un tratamiento de digestión con DNAsas. En los carriles 3-6 se ha cargado el lipoplejo  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA tras la digestión con DNAsas y posterior tratamiento con tensioactivos aniónicos que rompen el lipoplejo y dejan libre al plásmido compactado. Por tanto, la ausencia de bandas fluorescentes en el carril 2 y la presencia en los carriles 3 a 6 de ambos geles (a y b) es el fiel indicativo de que la DNasa I ha degradado el plásmido libre del carril 2, pero no ha tenido acceso al plásmido compactado por el vector  $C_6C_{22}C_6/DOPE$  a ninguna de las composiciones  $\alpha$  ( $= 0,2$  y  $0,5$ ) y relaciones de carga efectivas  $\rho_{eff}$  ( $= 4$  y  $10$ ) estudiadas. Las bandas fluorescentes en la zona alta de los carriles (en ambos geles) corresponden a fragmentos de pDNA (con sonda fluorescente intercalada), provenientes de la acción de enzimas de restricción.

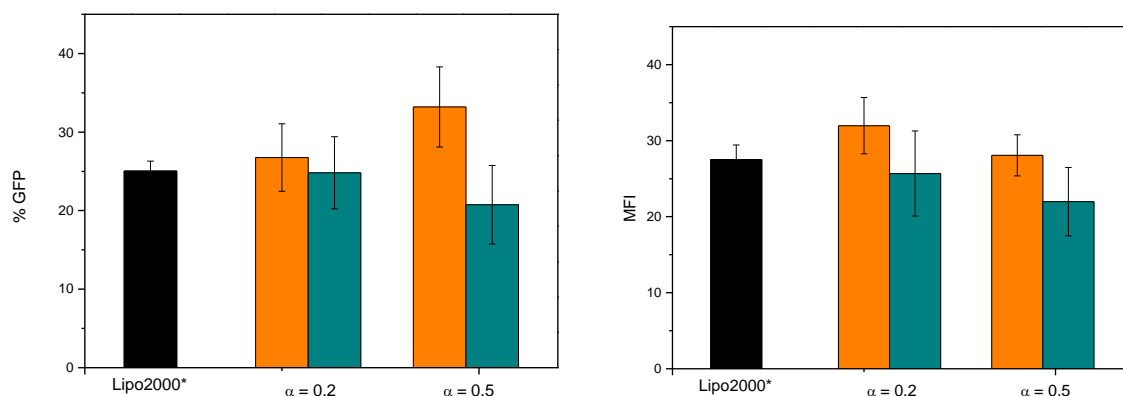


**Figura 5.15.** Ensayo de protección del pDNA frente a la DNasa I (experimento de gel electroforesis): a) plásmido pEGFP-C3 y b) plásmido pCMV-Luc. En ambos experimentos: carril 1, pDNA; carril 2, pDNA-DNases; y carriles 3-6, lipoplejos  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA a diferentes composiciones del sistema coloidal  $\alpha$ , ( $\alpha = 0,2$ , carriles 3-4, y  $\alpha = 0,5$ , carriles 5-6), y a diferentes relaciones de carga efectiva,  $\rho_{eff} = 4$ , (carriles 3 y 5) y  $\rho_{eff} = 10$ , (carriles 4 y 6).

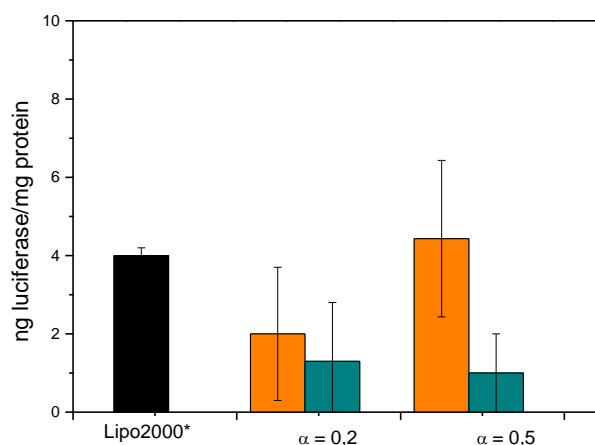
Estas evidencias permiten concluir que el sistema  $C_6C_{22}C_6/DOPE$  reúne las características necesarias para ser, al menos potencialmente, un buen vector del DNA, ya que es capaz de compactarlo, protegerlo adecuadamente de la DNasa I, y transportarlo a través de la membrana hacia el interior celular. Para verificar si este proceso se lleva realmente a cabo de una forma eficiente y segura, se han llevado a cabo experimentos de transfección y ensayos de viabilidad celular con células COS-7 (en presencia de 10 % de suero). Las Figuras 5.16 y 5.17 muestran los resultados obtenidos para los plásmidos pEGFP-C3 y pCMV-Luc, respectivamente. En el primero de los casos, se evalúa la eficiencia transfectora a partir de niveles de expresión de la proteína GFP



(para el plásmido pEGFP-C3), expresada en términos de %GFP (% de células que expresan GFP) y/o MFI (intensidad media de fluorescencia), obtenidos a partir de experimentos de FACS. En el segundo caso, se recurre a experimentos de luminometría para cuantificar la luciferasa expresada por el plásmido pCMV-Luc, en términos de ng de luciferasa / mg de proteína. Para llevar a cabo estos experimentos, se ha trabajado con el sistema  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE-pDNA a  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , y a dos relaciones de carga diferentes,  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $10$ , utilizando Lipofectamina 2000 (Lipo2000\*) como control positivo. Los resultados recogidos en la Figura 5.16, evaluados en su conjunto, muestran que los niveles de TE son mejores a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  que para  $\rho_{\text{eff}} = 10$ , tanto a  $\alpha = 0,2$  como a  $\alpha = 0,5$ . En particular, los valores de % GFP y MFI a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $\alpha = 0,2$  o  $0,5$  son comparables o incluso algo superiores a los del control Lipo2000\*, mientras que a  $\rho_{\text{eff}} = 10$  son iguales o algo inferiores al control. Por otra parte, en la Figura 5.17 se pone de manifiesto que existe una clara superioridad en los ng de luciferasa expresados por mg de proteína obtenidos a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  con respecto a los obtenidos a  $\rho_{\text{eff}} = 10$ , a las dos composiciones  $\alpha$  estudiadas, siendo los niveles de TE comparables a los del control sólo a  $\alpha = 0,5$ .



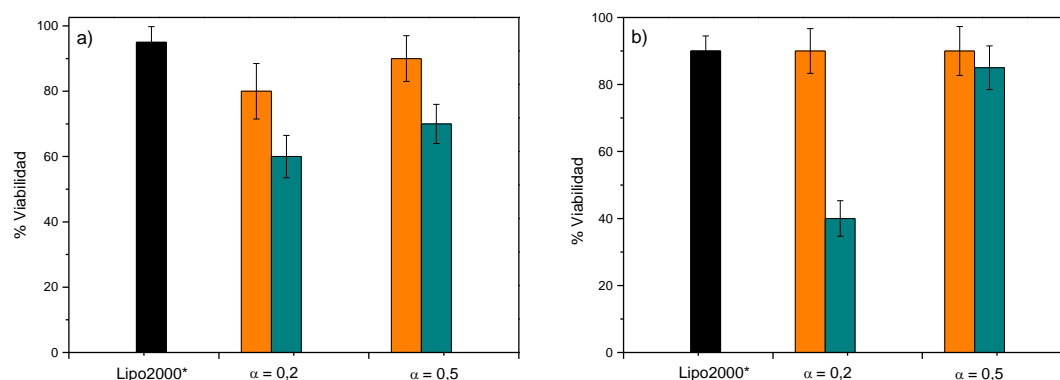
**Figura 5.16.** Valores de eficacia de transfección, expresada en % GFP (a) y MFI (b) de los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE-pEGFP a dos composiciones molares,  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , en células COS-7. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de 10% de suero (FBS). Negro: control Lipo2000\*. Naranja y verde corresponden a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $10$ .



**Figura 5.17.** Valores de eficacia de transfección, expresada en ng de luciferasa / mg de proteína de los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE- pCMV-Luc a dos composiciones molares,  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , en células COS-7. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de 10% de suero (FBS). Negro: control Lipo2000\*. Naranja y verde corresponden a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $10$ .



Como ya se ha explicado con anterioridad en esta Memoria, de nada sirve que el vector elegido sea un eficiente sistema de compactación, protección y transporte del plásmido, si posteriormente resulta dañino (tóxico) en un entorno celular, por lo que los niveles de citotoxicidad del lipoplejo  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA en células COS-7 fueron evaluados mediante un ensayo con Alamar Blue en las mismas condiciones (composiciones molares y relaciones de carga) que el experimento anterior de transfección celular. La Figura 5.18 (a y b) reporta los resultados obtenidos para los lipoplejos con los plásmidos pEGFP-C3 y pCMV-Luc, respectivamente. Se admite que porcentajes de viabilidad por encima de 60% son razonablemente aceptables, siendo deseable que los valores obtenidos estén por encima de 80%. Es remarcable que los niveles de viabilidad celular obtenidos están por encima del 80% en ambos casos para  $\rho_{eff} = 4$  a ambas relaciones molares  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ . Sin embargo, a  $\rho_{eff} = 10$  la viabilidad cae claramente por debajo de 80%, y en algún caso incluso por debajo del 60%. Nótese que la viabilidad celular del control Lipo2000\* está en torno al 90%, por lo que se puede concluir que el nanovector utilizado presenta viabilidades celulares comparables a las del control, a relaciones de carga  $\rho_{eff} = 4$ .



**Figura 5.18.** Valores de viabilidad celular de células COS-7 en presencia de lipoplejos  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA, a dos relaciones molares ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ): a) con plásmido pEGFP-C3, y b) con plásmido pCMV-Luc. Negro: control Lipo2000\*. Naranja y verde corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ .

Estos resultados están en concordancia con otros reportados previamente en sistemas similares, pudiéndose concluir que la viabilidad de las células se compromete seriamente a altos valores de  $\rho_{eff}$ , es decir, cuando el contenido en lípido catiónico es alto, como cabía esperar.<sup>24</sup>

Con la idea de correlacionar estos resultados bioquímicos de actividad y viabilidad celular con la estructura y morfología de los lipoplejos estudiados, se prepararon muestras a la relación de cargas para la que se habían obtenido los mejores resultados en los ensayos bioquímicos previos, es decir  $\rho_{eff} = 4$ , y se llevaron a cabo experimentos de DLS, SAXS y crio-TEM, a distintas composiciones del sistema coloidal mixto. La Tabla 5.4 resume los datos de tamaños (diámetros hidrodinámicos,  $D_h$ ) y podispersidades (PDI) a  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , y a  $\rho_{eff} = 4$  and  $10$ . Los tamaños obtenidos, en el intervalo 100-200 nm, y su razonablemente buena homogeneidad (polidispersidades bajas, con PDIs en torno a 0,2-0,3), apuntan a estos lipoplejos como nanovectores de DNA potencialmente muy adecuados, ya que estos valores se encuentra en el intervalo óptimo para atravesar la membrana celular y para circular en el

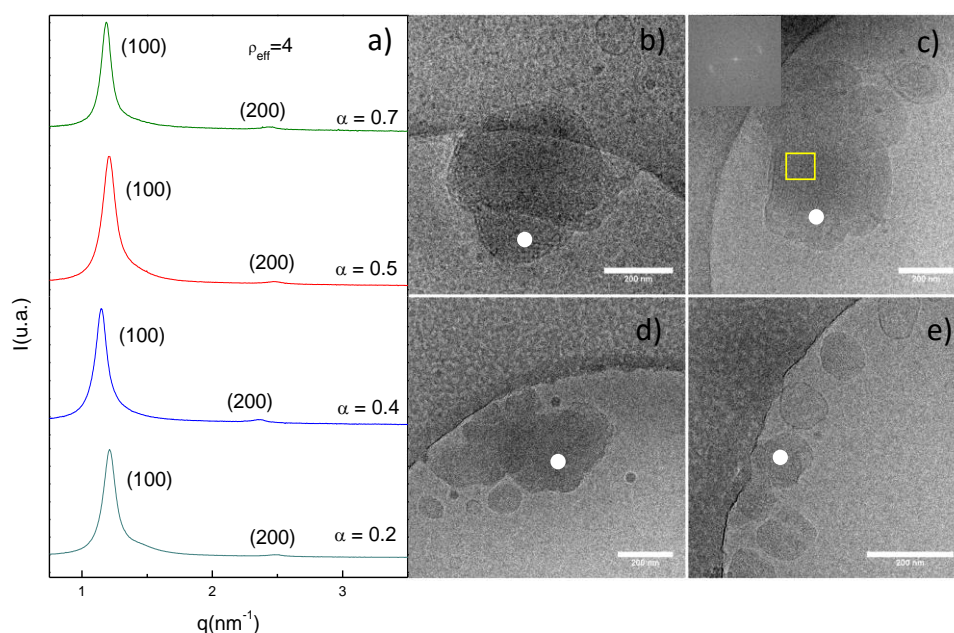
torrente sanguíneo. No se aprecia ningún efecto significativo de la composición molar del nanoagregado coloidal mixto, ni de la relación de cargas efectiva en ninguno de estos dos parámetros.

**Tabla 5.4.** Valores de diámetros hidrodinámicos ( $D_h$ ) e índices de polidispersidad (PDI) de los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE-pDNA a  $\rho_{eff} = 4$  y 10, y a dos composiciones molares del sistema coloidal mixto,  $\alpha = 0,2$  y  $\alpha = 0,5$ .

	$\rho_{eff} = 4$		$\rho_{eff} = 10$	
	$D_h$ (nm)	PDI	$D_h$ (nm)	PDI
$\alpha = 0,2$				
$C_6C_{22}C_6$ /DOPE- pEGFP-C3	129	0,25	134	0,24
$C_6C_{22}C_6$ /DOPE- pCMV-Luc	130	0,23	115	0,19
$\alpha = 0,5$				
$C_6C_{22}C_6$ /DOPE- pEGFP-C3	161	0,15	141	0,11
$C_6C_{22}C_6$ /DOPE- pCMV-Luc	212	0,34	183	0,30

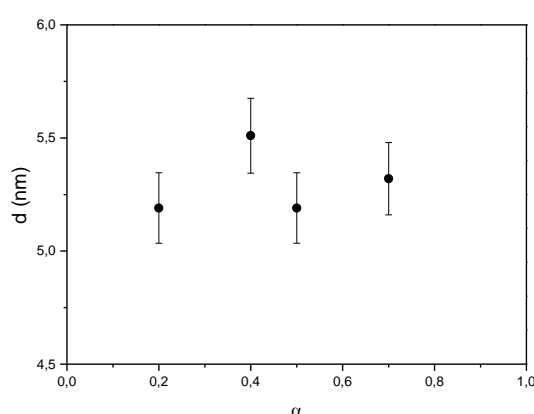
Errores inferiores a un 10%

Por otra parte, la Figura 5.19 resume los resultados de SAXS y crio-TEM a  $\rho_{eff} = 4$  y a varias composiciones molares,  $\alpha = 0,2$ ; 0,4; 0,5 y 0,7 en SAXS y  $\alpha = 0,2$  y 0,5 en crio-TEM. Ambas técnicas experimentales ponen en evidencia que estos lipoplejos se auto-organizan en fases multilamelares  $L_\alpha$  de cristal líquido liotrópico (señaladas con un punto blanco en las micrografías), análogas a las encontradas en los sistemas lipídicos anteriormente presentados, observándose en algunos casos patrones claros de huella dactilar (FP, *finger print*). La composición  $\alpha$  del sistema coloidal mixto no tiene ningún efecto en este comportamiento, ya que estas fases lamelares aparecen independientemente del valor de  $\alpha$ . La repetición periódica de bicapas lipídicas se estudió en el caso de crio-TEM llevando a cabo un análisis FFT (*Fast-Fourier-Transform*) sobre ciertas zonas de las micrografías (enmarcadas con un cuadrado amarillo) donde se encontraron patrones de agregación multilamelar. Véase, a modo de ejemplo, el recuadro situado en el panel c de la Figura 5.19, donde puede observarse los spots de difracción característicos de estructuras lamelares.



**Figura 5.19.** Difractogramas de SAXS (a) y selección de micrografías de crio-TEM (b-e) de los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA a  $\rho_{eff} = 4$  y diferentes composiciones molares:  $\alpha = 0,2$ ;  $0,4$ ;  $0,5$  y  $0,7$  en SAXS y  $\alpha = 0,2$  (b-c) y  $0,5$  (d-e) en crio-TEM.

Por último, los máximos de Bragg reportados en los difractogramas de SAXS (Figura 5.19a) indexan bien con los índices de Miller  $hkl$  (indicados sobre los máximos) correspondientes a estructuras  $L_\alpha$ . Como ya se ha explicado con detalle en sistemas anteriores, a partir del valor del vector de ondas  $q$  correspondiente al primer máximo,  $hkl$  (100), de mayor intensidad, se puede determinar la distancia interlamelar ( $d = 2\pi / q_{100}$ ). Como puede observarse en la Figura 5.20,  $d$  no experimenta cambios apreciables con la composición del sistema lipídico mixto,  $\alpha$ , obteniéndose un valor promedio de  $d = (5,3 \pm 0,3)$  nm aproximadamente constante dentro del error experimental.



**Figura 5.20.** Valores de la distancia interlamelar  $d$ , obtenida a partir del primer máximo de los difractogramas de SAXS, en función de la composición del sistema  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ , para la fase multilamelar  $L_\alpha$  de los lipoplejos  $C_6C_{22}C_6/DOPE$ -pDNA, a  $\rho_{eff} = 4$ .

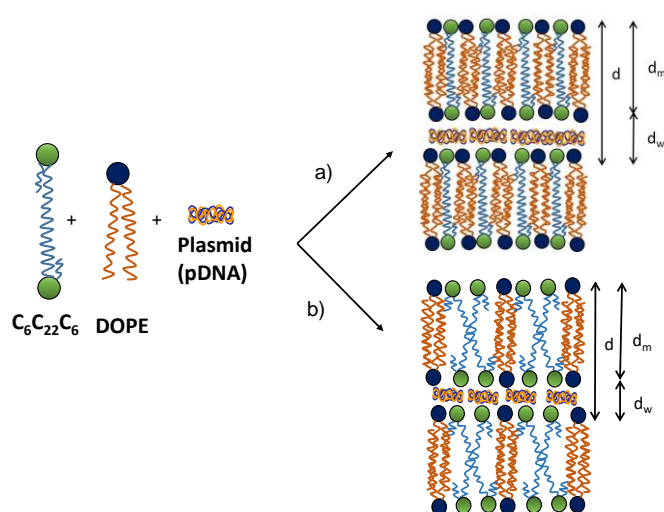
Como ya se ha explicado en anteriores apartados, esta distancia  $d$  es la suma de dos espesores: el de la región donde las cadenas hidrofóbicas del lípido se

auto-agregan, tradicionalmente identificado como  $d_m$ , y el de la región acuosa donde se localiza el plásmido, conocido como  $d_w$ . Dada la peculiar estructura del lípido catiónico utilizado  $C_6C_{22}C_6$ , podrían plantearse dos ordenamientos alternativos, ambos compatibles con el esquema multilamelar de las fases  $L_\alpha$  encontrado:

a) alternancia de monocapas de  $C_6C_{22}C_6$ , donde es el espaciador de 22 átomos de C el que conforma la monocapa, quedando las cadenas de 6 átomos de C orientadas hacia el interior de la misma y dejando las 2 cabezas catiónicas de amonio cuaternario expuestas a sendos lados de la monocapa. Esta disposición impone un cierto entrecruzamiento de cadenas hidrofóbicas a las moléculas de DOPE (de 18 átomos de C) que se encuentren a ambos lados de la monocapa, para poder ajustarse bien al espesor  $d_m$  impuesto por los 22 átomos de C. Entre cada par de monocapas así conformadas, habría otra monocapa acuosa, de espesor  $d_w$ , donde se aloja el plásmido; o

b) alternancia de bicapas lipídicas constituidas por una mezcla de  $C_6C_{22}C_6$  y DOPE ( $d_m$ ), compactando a los plásmidos alojados en la monocapa acuosa ( $d_w$ ), es decir, la estructura habitual presentada por estos sistemas lipídicos autoagregados en fases multilamelares, ya vista y dibujada en un apartado anterior. Ciertamente, la peculiar característica de este lípido, con un espaciador entre sus cabezas catiónicas de 22 átomos de C, justifica el hecho de que el espaciador esté obligado a doblarse, en forma de V, para poder acomodarse a la bicapa.

La Figura 5.21 muestra una visión 2D simplificada de la estructura  $L_\alpha$  presentada por estos lipoplejos, con las dos opciones antes comentadas. En cualquiera de los dos casos, bien sea como monocapa o como bicapa lipídica, su espesor podría estimarse en torno a 2,6 nm, lo que conduciría a un espesor  $d_w$  del orden de 2,7 nm, suficiente para alojar los plásmidos de DNA.

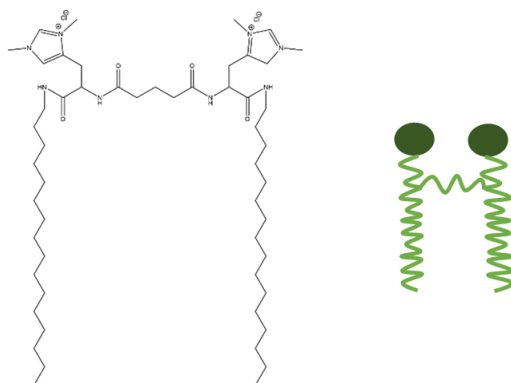


**Figura 5.21.** Dibujos esquemáticos del lípido bicatiónico ( $C_6C_{22}C_6$ ), lípido zwitteriónico (DOPE), y pDNAs (pEGFP-C3 o pCMV-Luc). Visión 2D simplificada de la fase multilamelar  $L_\alpha$ , con dos posibles opciones estructurales (a y b) compatibles con los resultados crio-TEM y SAXS.

Se puede concluir, por tanto, que el lípido catiónico  $C_6C_{22}C_6$ , con una estructura híbrida entre la de un lípido gemini y la de un lípido bolaforme, mezclado con DOPE y plásmidos de DNA, forman lipoplejos que presentan nanoestructuras multilamelares ( $L_\alpha$ ) con tamaños en el intervalo 100-200 nm, muy adecuados para mantenerse en el torrente sanguíneo, crucial en estudios *in vivo*, y para atravesar la membrana celular, muy importante en el proceso de transfección. La mezcla  $C_6C_{22}C_6$ /DOPE ha demostrado, además, su capacidad para compactar, proteger y transfectar plásmidos de DNA de distintas características a células COS-7. Y lo hace con una eficacia superior a la presentada por el control universal Lipo2000\*, siempre que la relación de cargas efectiva  $\rho_{eff}$  se mantenga en valores bajos. Además, en estas condiciones la viabilidad de las células COS-7 se mantiene en altos niveles, superiores al 80%.

• **Vector lipídico gemini con grupos histidina en las cabezas.**

Por último, dentro de este apartado de vectores lipídicos, y más en concreto, dentro de la categoría de GCLs (lípidos catiónicos gemini), se ha evaluado el potencial de un lípido constituido por dos cabezas catiónicas que corresponden a dos restos de histidina, unidas a sendas colas hidrofóbicas de 16C, y separadas por un espaciador que contiene grupos CO y grupos metilénicos ( $C_{16}His$ , ver Figura 5.22). Se trata, por tanto, de valorar si la presencia de restos de aminoácidos catiónicos en las cabezas del GCL mejora las tasas de TE y la biodisponibilidad del vector (disminuyendo su citotoxicidad).



**Figura 5.22.** Estructura y dibujo esquemático del lípido  $C_{16}His$

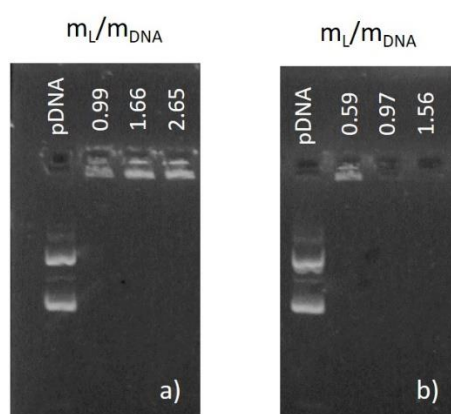
Para ello, se han preparado primero los vectores mixtos  $C_{16}His$ /DOPE a distintas fracciones molares del lípido catiónico y se han mezclado posteriormente con los plásmidos pEGFP-C3 y pCMV-Luc, siguiendo los protocolos experimentales explicados con anterioridad.

El estudio se ha planteado de la siguiente forma: i) evaluación del grado de compactación y de protección contra enzimas degradantes que el vector ejerce sobre el plásmido, haciendo uso de técnicas electroforéticas (geles de agarosa); ii) determinación de cargas efectivas mediante experimentos de potencial zeta y siguiendo el protocolo de cálculo descrito con detalle en un apartado previo de esta Memoria; iii) evaluación de la capacidad de estos vectores para transfectar los plásmidos utilizados a células COS-7 en presencia de suero y de la viabilidad celular de las mismas (FACS, luminometría y ensayo de Alamar Blue); y iv) caracterización estructural (SAXS, anisotropía de fluorescencia y DLS) de

aquellos lipoplejos que hayan arrojado los niveles óptimos en el apartado anterior, es decir, los mejores niveles de TE conjugados con los valores más bajos de citotoxicidad (o más altas viabilidades celulares).

En la Figura 5.23 se muestran los geles de agarosa de los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA a dos composiciones molares,  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ , del sistema lipídico y a diferentes relaciones de masas de lípido mixto ( $m_L / m_{DNA}$ ), donde  $m_L = m_{L^+} + m_{L^0}$ . El primer carril, correspondiente al control, muestra el plásmido libre, pudiéndose observar las bandas fluorescentes que corresponden a las formas enrollada y superenrollada de dicho plásmido con la sonda GelRed intercalada. La ausencia de bandas fluorescentes en el resto de carriles implica que el plásmido ha sido eficientemente compactado por el lípido mixto C<sub>16</sub>His/DOPE. Por tanto, a la vista de la figura, se puede concluir que esta compactación ya se ha producido a relaciones de masa  $m_L / m_{DNA}$  de 1 y 0,6 para  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$  respectivamente.

Con el objetivo de precisar más la relación  $m_L / m_{DNA}$  a la que existe una inversión de carga neta en el sistema donde las cargas positivas se igualan a las negativas, es decir, la razón de electroneutralidad del mismo,  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$ , se ha recurrido, como en las secciones precedentes, a experimentos de movilidad electroforética-potencial zeta a las diferentes relaciones de masas. La Figura 5.24 recoge estos resultados para diferentes composiciones molares  $\alpha$ , observándose de nuevo un hábito típicamente sigmoidal con una inversión de carga para  $\rho_{eff} = 1$ . Como está descrito anteriormente, a partir de los valores de electroneutralidad del lipoplejo C<sub>16</sub>His/DOPE-ctDNA a  $\alpha = 0,5$  (línea punteada), se calcula el valor de la carga efectiva del lípido catiónico,  $q_{eff, C_{16}His}^-$ . Los resultados revelan que el lípido catiónico, al igual que en lípidos catiónicos con derivados de aminoácidos estudiados previamente<sup>12</sup>, el lípido C<sub>16</sub>His, presenta prácticamente la totalidad de su carga positiva  $q_{eff, C_{16}His}^- = (1,9 \pm 0,1)$ .

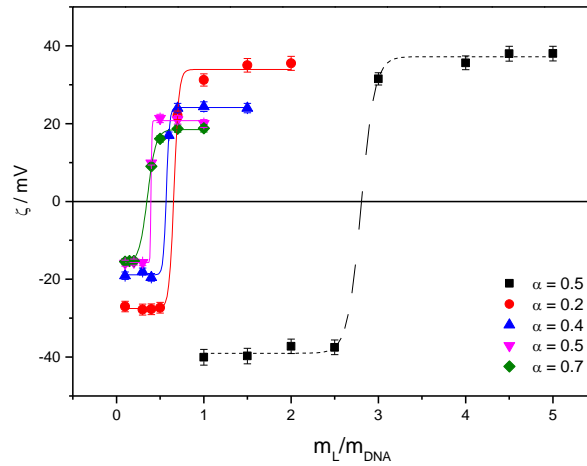


**Figura 5.23.** Electroforesis en gel de agarosa de los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA a distintas composiciones molares del lípido catiónico: a)  $\alpha = 0,2$  y b)  $\alpha = 0,5$ . El primer carril corresponde al plásmido libre. Resto de carriles, lipoplejos a distintas relaciones ( $m_L / m_{DNA}$ ), indicadas con números blancos en la cabecera del carril.

De nuevo, puede observarse en la Figura 5.24 que la electroneutralidad en los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA se alcanza a valores menores que los



correspondientes a los lipoplejos formados con ctDNA, ya que cuando los nanoagregados compactan el pDNA, éste mantiene asociados una parte importante de sus contraiones sodio. Una vez establecida la carga del GCL, se ha determinado la carga efectiva del pDNA,  $q_{eff,pDNA}^-$ , a diferentes relaciones molares  $\alpha = 0,2; 0,4; 0,5$  y  $0,7$  (ver Tabla 5.5). Para ello, se ha seguido el procedimiento detallado en el apartado 5.1.1, haciendo uso de los valores de electroneutralidad de los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA y de la ecuación 5.5



**Figura 5.24.** Valores de potencial zeta en función de  $m_L / m_{DNA}$  para el lipoplejo C<sub>16</sub>His/DOPE-DNA, utilizando ctDNA (línea punteada) y plásmido pDNA (línea continua).

**Tabla 5.5.** Relaciones de electroneutralidad  $(m_L / m_{DNA})_\Phi$  de los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA y carga efectiva del pDNA,  $q_{eff,pDNA}^-$

$\alpha$	0,2	0,4	0,5	0,7
$(m_L / m_{DNA})_\Phi$	0,65	0,57	0,39	0,35
$q_{eff,pDNA}^- / bp$	-0,20	-0,30	-0,27	-0,33

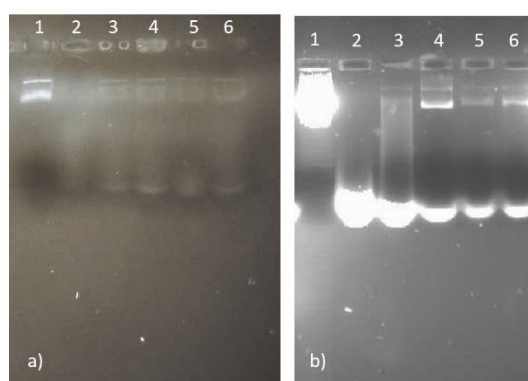
Errores menores a un 5%

El valor promedio de la carga efectiva de pDNA es de  $q_{eff,pDNA}^- = (-0,27 \pm 0,05)$  por par de bases, es decir, tan sólo un 14 % de su carga nominal. Una carga efectiva de pDNA tan baja es una ventaja para nuestros objetivos, ya que implica una menor cantidad de lípido catiónico necesario para compactar el pDNA, y por tanto una citotoxicidad potencialmente menor.

Una vez obtenidas las cargas efectivas tanto del vector catiónico como del plásmido, es necesario evaluar la capacidad de dicho vector para proteger el material genético frente a la DNasa I, presente en el suero humano. Dado que una de las propiedades fundamentales del vector es que sea capaz de proteger cualquier material genético que vaya a transportar, en estos experimentos se han utilizado dos tipos de plásmido, uno que codifica para la GFP (pEGFP-C3) y otro codificante para la luciferasa (pCMV-Luc). Como se explicó con detalle en la sección Experimental, estos experimentos consisten en incubar los lipoplejos a 37°C en presencia de la enzima DNasa I, someterlos posteriormente a un

proceso de desacomplejación con tensioactivos aniónicos, para finalizar con medidas de electroforesis en gel de agarosa, como los que se muestran en la Figura 5.25, para los lipoplejos constituidos por C<sub>16</sub>His/DOPE y los dos plásmidos antes comentados.

Los dos primeros carriles corresponden al plásmido libre, sin tratar con enzimas degradantes (carril 1) y previamente incubados con dichas enzimas (carril 2). En el resto de carriles se ubican los lipoplejos una vez han sido desagregados con tensioactivos aniónicos. La presencia de bandas fluorescentes en las posiciones características de las formas enrollada y super-enrollada del plásmido es indicativas de que fue adecuadamente protegido por el vector, de tal forma que la DNAsa I no tuvo acceso al plásmido. Además, se observan también las bandas correspondientes a pequeños fragmentos de plásmido (que, por consiguiente, presentan un mayor avance en el carril) procedentes de la acción de enzimas de restricción. A la vista, por tanto de la Figura 5.25, se puede afirmar que los nanoagregados de C<sub>16</sub>His/DOPE son capaces no sólo de compactar sino también de proteger ambos tipos de plásmido.

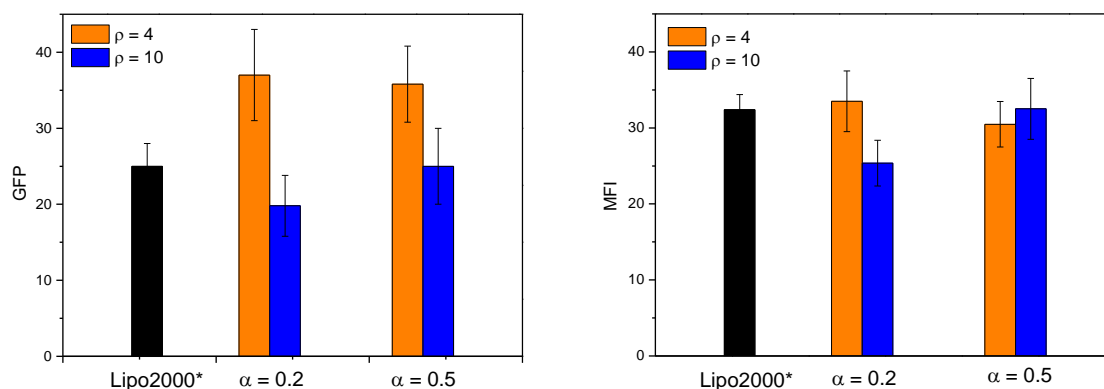


**Figura 5.25.** Ensayos de protección del plásmido frente a degradación con DNAsa I (electroforesis en gel de agarosa): a) plásmido pEGFP-C3; y b) plásmido pCMV-Luc (b). Carril 1, pDNA; carril 2, pDNA-DNAsas. Carriles 3-6, lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA tras incubación con DNAsa I y posterior descompactación con tensioactivos aniónicos, a diferentes fracciones molares:  $\alpha = 0,2$ , carriles 3-4, y  $\alpha = 0,5$ , carriles 5-6; y a diferentes relaciones de carga efectiva:  $\rho_{\text{eff}} = 4$ , carriles 3 y 5 y  $\rho_{\text{eff}} = 10$  carriles 4 y 6.

Puesto que se ha comprobado que el sistema C<sub>16</sub>His/DOPE es capaz de compactar y proteger adecuadamente el ácido nucleico, y sabiendo que el cometido final pasa porque el vector sea capaz de atravesar la membrana celular y liberar el plásmido en el citoplasma de la célula, se han llevado a cabo experimentos de eficacia de transfección y viabilidad celular.

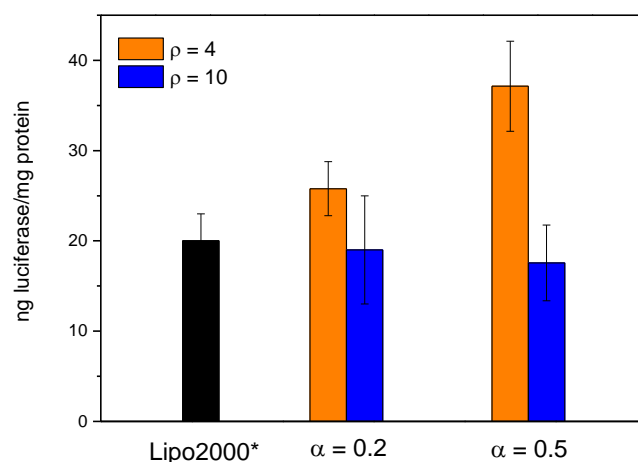
Como en sistemas anteriores, la eficacia de transfección de los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE se ha evaluado a través de medidas de %GFP y MFI (experimentos de FACS) en el caso del plásmido pEGFP-C3, que codifica a GFP (Figura 5.26), y a partir de medidas de luminometría en el caso del plásmido pCMV-Luc (ng de luciferasa por mg de proteína), que codifica a Luciferasa (Figura 5.27). En ambos casos, se ha trabajado con la línea celular COS-7 y en presencia de un 10% de suero.





**Figura 5.26.** Eficacia de transfección (%GFP y MFI) del lipoplejo  $C_{16}His/DOPE$ -pEGFP-C3 en células COS-7, a dos fracciones molares  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ . Los experimentos se han realizado con un 10% de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y azules corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ , respectivamente.

Valorando en conjunto los resultados mostrados en la Figura 5.26, se podría concluir que los valores óptimos de eficacia de transfección en los lipoplejos  $C_{16}His/DOPE$ -pEGFP se alcanzan a una composición del sistema lipídico mixto  $\alpha = 0,2$  y a relación de carga efectiva del lipoplejo  $\rho_{eff} = 4$ . Nótese que en estas condiciones, las prestaciones del vector mejoran las obtenidas con el estándar universal Lipo2000\*.

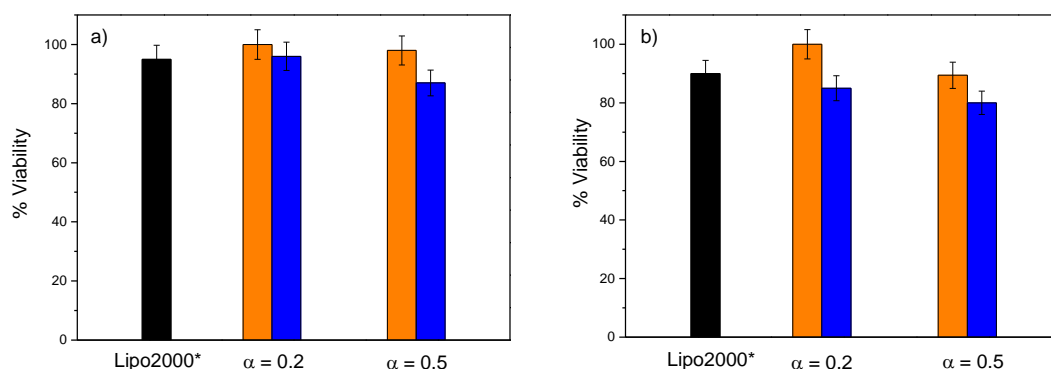


**Figura 5.27.** Eficacia de transfección del lipoplejo  $C_{16}His/DOPE$ -pCMV-Luc en células COS-7, a dos fracciones molares  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ . Los experimentos se han realizado con un 10% de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y azules corresponden a  $\rho_{eff} = 4$  y  $10$ , respectivamente.

Similares conclusiones pueden extraerse de los resultados mostrados en la Figura 5.27 en lo que respecta a la superioridad de los niveles de transfección obtenidos a  $\rho_{eff} = 4$  con respecto a los obtenidos a  $\rho_{eff} = 10$ . Sin embargo, en este caso, aunque las prestaciones del vector estudiado son mejores que las del control a las dos  $\alpha$  analizadas, parece que la composición equimolecular conduce a niveles de expresión algo mejores.

Por otra parte, puesto que se requiere que el vector no sólo sea eficaz, si no que no sea tóxico para las células, se han realizado ensayos de viabilidad celular en la línea COS-7, utilizando ambos tipos de plásmido (véase Figura 5.28). Como

puede observarse en la figura, de nuevo los resultados a  $\alpha = 0,2$  y  $\rho_{\text{eff}} = 4$  son los mejores, superando ligeramente incluso las viabilidades celulares obtenidas con el control



**Figura 5.28.** Viabilidad celular de las células COS-7 en presencia de lipoplejos  $C_{16}\text{His}/\text{DOPE-pDNA}$ , a dos fracciones molares,  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ : a) plásmido pEGFP-C3 y b) plásmido pCMV-Luc. Los experimentos se han realizado con un 10% de suero (FBS). Se ha usado como control positivo Lipo2000\* (barras negras). Las barras naranjas y azules corresponden a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y  $10$ , respectivamente.

De los experimentos anteriores se puede concluir, por tanto, que el vector  $C_{16}\text{His}/\text{DOPE}$  tiene la capacidad de compactar, proteger y liberar pDNA de forma eficiente y segura, siendo la relación de cargas efectiva  $\rho_{\text{eff}} = 4$  la que parece arrojar los mejores resultados, incluso por encima del estándar Lipo2000\*. En cuanto a la composición óptima del sistema lipídico mixto, aunque parece intuirse que  $\alpha = 0,2$  sea la mejor, los resultados no son concluyentes, por lo que se procedió a caracterizar estructuralmente los lipoplejos  $C_{16}\text{His}/\text{DOPE-pDNA}$  a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y las dos composiciones molares  $\alpha$  estudiadas en los experimentos bioquímicos, es decir  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ .

Esta caracterización estructural se ha basado esencialmente en: i) evaluar el tamaño de los lipoplejos, conjuntamente con la homogeneidad de los mismos, mediante medidas de DLS (Tabla 5.6); ii) valorar el grado de fluidez de las membranas lipídicas mediante medidas de anisotropía de fluorescencia de una sonda debidamente solubilizada en el interior de las bicapas (Figura 5.29); y iii) determinar el patrón de agregación que presentan los lipoplejos mediante experimentos de SAXS (Figura 5.31).

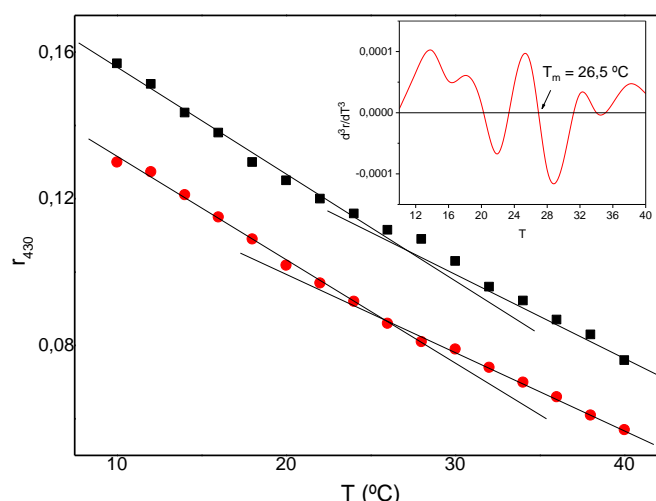
Puede observarse en la Tabla 5.6 que los lipoplejos  $C_{16}\text{His}/\text{DOPE-pDNA}$  presentan tamaños en el intervalo 120-180 nm, sin advertirse un claro efecto ni de la composición molar  $\alpha$ , ni de la relación de cargas  $\rho_{\text{eff}}$ . Estos valores resultan muy adecuados para atravesar la membrana celular, clave en el proceso de transfección, y para mantenerse en el torrente sanguíneo, aspecto crucial en estudios *in vivo*. Además, otro factor favorable a este respecto es la homogeneidad en la distribución de tamaños, como se desprende de los bajos valores de polidispersidad (PDI) obtenidos, en el intervalo 0,2-0,3.

**Tabla 5.6.** Diámetros hidrodinámicos,  $D_h$ , y polidispersidades (PDI) de los lipoplejos  $C_{16}His/DOPE$ -pDNA (con los dos plásmidos utilizados, pEGFP-C3 y pCMV-Luc), a dos fracciones molares,  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ .

	$\rho_{eff} = 4$		$\rho_{eff} = 10$	
	$D_h$ (nm)	PDI	$D_h$ (nm)	PDI
$\alpha = 0,2$				
$C_{16}His/DOPE$ -pEGFP-C3	170	0,17	136	0,11
$C_{16}His/DOPE$ -pCMV-Luc	177	0,27	119	0,15
$\alpha = 0,5$				
$C_{16}His/DOPE$ -pEGFP-C3	147	0,12	177	0,40
$C_{16}His/DOPE$ -pCMV-Luc	154	0,19	185	0,26

Errores menores a un 10%

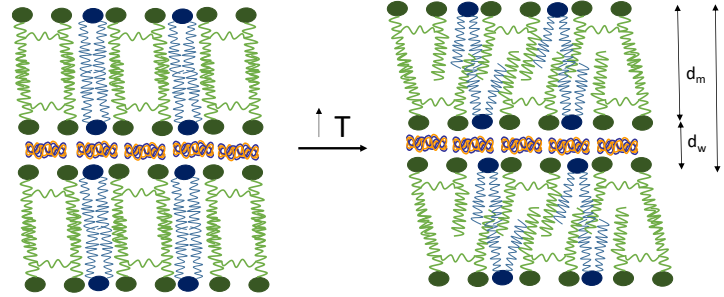
Por otra parte, la Figura 5.29 muestra las medidas de anisotropía de fluorescencia a 430 nm para la sonda DPH, localizada en la bicapa lipídica, en función de la temperatura. Se puede observar un decrecimiento monótono, para ambas  $\alpha$ , acorde a estudios reportados en la literatura, en los que se encuentran este tipo de perfiles cuando en el lipoplejo intervienen lípidos coadyuvantes que pertenecen a la familia de la fosfatidiletanolaminas, como el DOPE.<sup>25,26</sup>



**Figura 5.29.** Resultados de anisotropía de fluorescencia  $r_{430}$  en función de la temperatura, para el lipoplejo  $C_{16}His/DOPE$ -pDNA a  $\rho_{eff} = 4$  y composiciones molares  $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ . La figura pequeña (esquina superior derecha) muestra la determinación de  $T_m$  por el método de la tercera derivada, para  $\alpha = 0,2$ , a modo de ejemplo. Asimismo, se incluyen rectas pre- $T_m$  y post- $T_m$ .

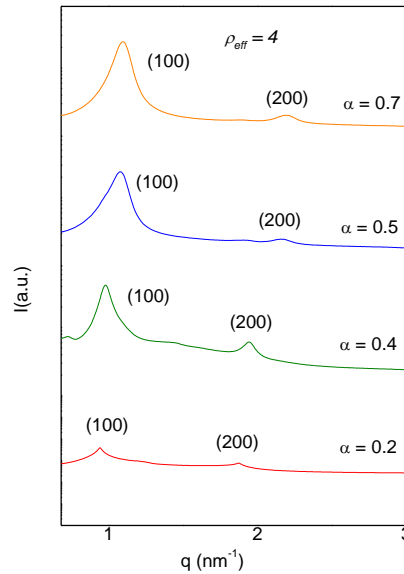
En ambos casos, la anisotropía disminuye con la temperatura, indicando que la fluidez de la bicapa aumenta (véase esquema ilustrativo en Figura 5.30). Utilizando el método de intersección de rectas o el método de la tercera derivada, se han obtenido los valores de temperatura de transición gel-fluido,  $T_m$ , resultando  $T_m = (26 \pm 1) ^\circ C$  en ambos casos ( $\alpha = 0,2$  y  $0,5$ ), lo que implica que el lipoplejo presenta una bicapa fluida a temperatura fisiológica ( $37^\circ C$ ), aspecto que favorece el proceso de internalización celular. Además, es destacable que en todo el intervalo de temperatura, los valores de anisotropía están por debajo de  $0,2$ , lo cual es característico de bicapas fluidas. En particular, los valores de anisotropía son especialmente bajos a temperatura

fisiológica  $r_{430} = (0,05-0,08)$  para ambas  $\alpha$ , lo que implica un nivel de fluidez muy apropiado para nuestros objetivos de utilizar los lipoplejos C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA como vectores génicos no virales *in vivo*.<sup>2</sup>



**Figura 5.30.** Esquema del aumento de la fluidez de las bicapas lipídicas con la temperatura. Transición gel-fluido a  $T = T_m$ .

Por último, en la Figura 5.31 se muestran los difractogramas de SAXS ( $I$  vs.  $q$ ) para una  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y a diferentes composiciones molares,  $\alpha$ . Como en casos anteriores, se observan máximos de difracción que indexan bien con los índices de Miller  $hkl$  (indicados en la figura) característicos de un patrón de agregación multilamellar  $L_\alpha$ , cuya distancia interlamelar,  $d$ , (ver Figura 5.30) se obtiene a partir de los valores del factor  $q$ , y mediante la ecuación  $d = 2\pi n / q_{100}$ , donde  $n$  es el orden de difracción. La Tabla 5.7 recoge los valores de  $q$  y  $d$  obtenidos en todos los difractogramas.



**Figura 5.31.** Difractogramas de SAXS para el lipoplejo C<sub>16</sub>His/DOPE-pDNA a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y a diferentes composiciones molares,  $\alpha$ . En paréntesis, los índices de Miller ( $hkl$ ) a los que indexan los máximos.

**Tabla 5.7.** Valores de  $q$  para los máximos (100) y (200) y de la distancia interlamelar,  $d$ , obtenida a partir del máximo de mayor intensidad (100), a  $\rho_{\text{eff}} = 4$  y a las diferentes composiciones molares,  $\alpha$ , estudiadas

	$L_\alpha$	$L_\alpha$	$L_\alpha$	$L_\alpha$
$\alpha$	0,2	0,4	0,5	0,7
$q_{100}$ (nm <sup>-1</sup> )	0,9	1,0	1,1	1,1
$q_{200}$ (nm <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	2,1	2,2
$d$ (nm)	6,7	6,5	5,7	5,7

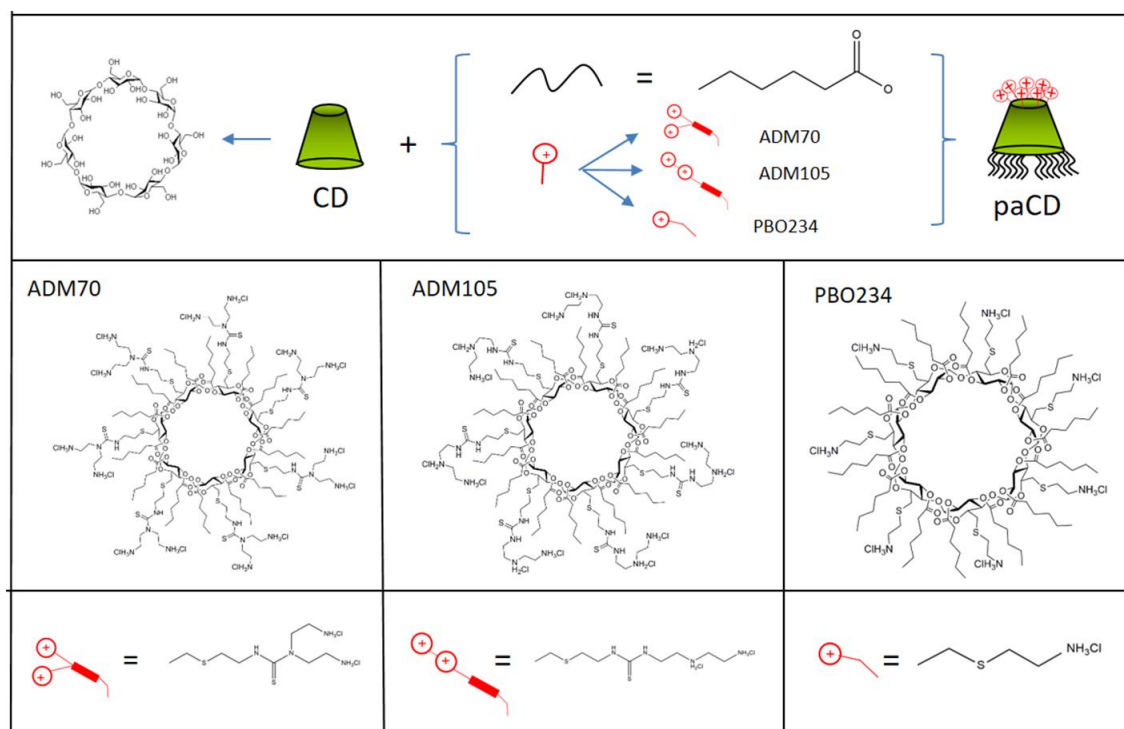
Errores menores al 5%

A la vista de los resultados resumidos en la Tabla 5.7, se puede concluir que la distancia interlamelar,  $d$ , se encuentra en el intervalo 5-7 nm, como viene siendo habitual en los sistemas lipídicos utilizados en esta Tesis, esencialmente en los que interviene el DOPE (con 18C) como lípido coadyuvante. Se advierte, incluso, cómo  $d$  aumenta ligeramente a medida que también lo hace el contenido de DOPE, es decir, según  $\alpha$  disminuye. Teniendo en cuenta el carácter parcialmente hidrofílico del espaciador de C<sub>16</sub>His y los 16C de sus cadenas hidrofóbicas, la bicapa lipídica mixta (C<sub>16</sub>His/DOPE) tendrá un espesor en torno a 3,8 nm ( $d_m$ ), dependiendo del contenido en DOPE (18C), lo que deja unos 2-3 nm de espesor ( $d_w$ ) para la monocapa acuosa donde se debe alojar el plásmido (ver Figura 5.30). Son todos valores consistentes con los encontrados en lipoplejos anteriores estructurados también en fases  $L_\alpha$  de cristal líquido liotrópico.

Se puede concluir, por tanto, que la mezcla C<sub>16</sub>His/DOPE constituye un vector con potenciales buenas prestaciones para compactar, proteger y transfectar distintos tipos de plásmidos a células (COS-7). Parece que un alto contenido en DOPE ( $\alpha = 0,2$ ) y una relación de cargas  $\rho_{\text{eff}} = 4$  favorecen el proceso. De hecho, los índices de eficacia de transfección y viabilidad celular son razonablemente buenos, y superiores a los arrojados por el control (Lipo2000\*). Posiblemente, una carga negativa efectiva del plásmido tan baja (sólo el 14 % de su carga nominal), sea una de las razones de las bajas tasas de citotoxicidad y buenos niveles de transfección. Sin duda, el hecho adicional de que el vector tenga una bicapa lipídica fluida a temperatura fisiológica y que su patrón de agregación sea el correspondiente a fases multilamelares  $L_\alpha$  de cristal líquido liotrópico ayuda, sin duda, a potenciar las buenas prestaciones de este vector. Su tamaño (junto con una distribución homogénea) está en un intervalo muy adecuado para favorecer su interacción con la membrana celular y su resistencia en el torrente sanguíneo. Resulta llamativa su superioridad en prestaciones como vector génico no viral, comparado con el lípido gemini C<sub>6</sub>(LL), estudiado en una Tesis Doctoral anterior del grupo<sup>12</sup>, caracterizado porque en su estructura tiene dos restos de lisina en las sendas cabezas catiónicas, en lugar de los restos de histidina del presente sistema. De nuevo, la presencia del grupo imidazol (His) provoca una clara mejora en la calidad del vector como agente de transfección; la deslocalización de la carga positiva característica del grupo imidazol podría ser la responsable de esta sinergia. Por todo lo expuesto, se puede concluir que el sistema C<sub>16</sub>His/DOPE se trata de un sistema lipídico potencialmente interesante como candidato para posteriores experimentos *in vivo*.

### 5.1.2. Vectores macrocíclicos: ciclodextrinas anfífilas policationicas (paCDS).

En aras de encontrar vectores cada vez más biocompatibles, se han caracterizado en esta Tesis Doctoral tres vectores macrocíclicos con matriz lipídica, pertenecientes a la familia de la ciclodextrinas anfífilas policationicas (paCDS), ampliamente descritas en el capítulo de *Antecedentes y Estado Actual* de esta Memoria. Se trata de los compuestos nombrados como ADM70, ADM105 y PBO234, cuya estructura se muestra en la Figura 5.32. Nótese que estas tres paCDS varían en el número y disposición de grupos amino y tiourea y han sido caracterizados en ausencia y en presencia de dos tipos diferentes de DNA (ctDNA y el plásmido pEGFP-C3) y a varias composiciones.



**Figura 5.32.** Dibujo esquemático de las tres paCS, ADM70, ADM105 y PBO234

Como se ha comentado con anterioridad en esta Memoria, la caracterización de los CDplejos (complejos paCD-pDNA) comienza con la determinación de las cargas efectivas de ambos constituyentes del complejo. Para ello, se ha hecho uso del protocolo propuesto por nuestro grupo, descrito con detalle en el apartado 5.1.1. Como en este caso el vector macrocíclico no va acompañado de lípido coadyuvante, las ecuaciones 5.5, 5.6 y 5.3 se transforman en las siguientes ecuaciones para la determinación de cargas efectivas de paCD, pDNA y relación de cargas efectivas, respectivamente:

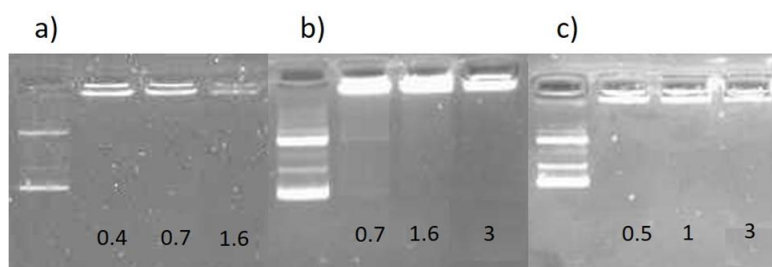
$$q_{eff,CD}^+ = q_{eff,linearDNA}^- \left( \frac{m_{CD}}{m_{linearDNA}} \right)^{-1} \frac{M_{CD}}{M_{bp}} \quad (5.7)$$

$$q_{eff,pDNA}^- = q_{eff,CD}^+ \left( \frac{m_{CD}}{m_{pDNA}} \right)_\Phi \frac{\overline{M}_{bp}}{\overline{M}_{CD}} \quad (5.8)$$

$$\rho_{eff} = \frac{n_+}{n_-} = \frac{q_{eff,CD}^+ (m_{CD} / \overline{M}_{CD})}{q_{eff,DNA}^- (m_{DNA} / \overline{M}_{bp})} \quad (5.9)$$

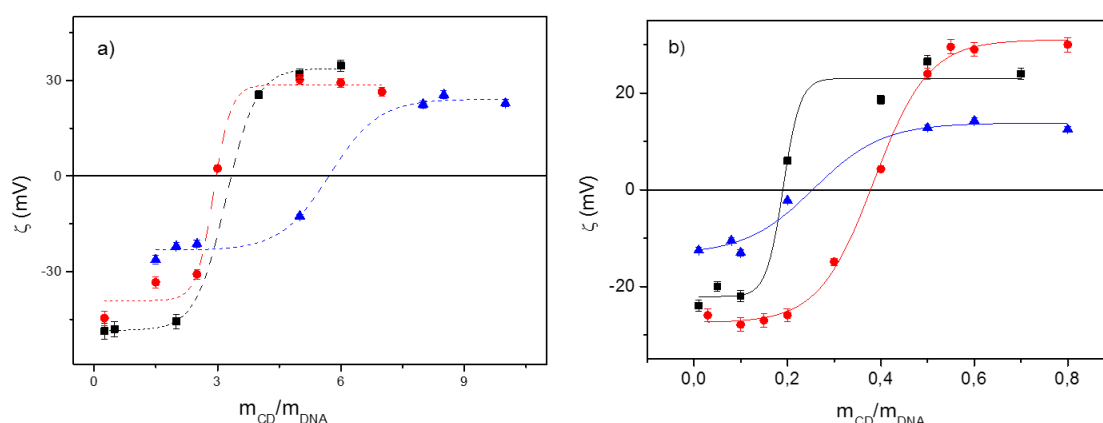
donde  $n^+$  y  $n^-$  son los moles de cargas positivas del vector paCD y negativas del pDNA;  $m_{CD}$  y  $m_{DNA}$  son las masas de vector paCD y ácido nucleico;  $\overline{M}_{CD}$  y  $\overline{M}_{bp}$  son las masas molares del vector y la masa molar promedio de DNA por par de bases (/bp);  $q_{eff,CD}^+$  y  $q_{eff,DNA}^-$  son las cargas efectivas de paCD y DNA por bp;  $(m_{CD} / m_{DNA})_\Phi$  representa la composición del CDplejo a la que las cargas positivas del vector y negativas del ácido nucleico se compensan, ( $n^+ = n^-$ ,  $\rho_{eff} = 1$ ), conocida como la relación de isoneutralidad. Este parámetro es característico de cada complejo y marca el límite inferior a partir del cual el CDplejo se convierte en un vector génico potencialmente eficiente puesto que su carga neta se ha hecho positiva, requisito imprescindible para interaccionar favorablemente y atravesar la membrana celular, cargada negativamente.

Las técnicas electroquímicas son, entre otras, las más adecuadas para determinar la relación de isoneutralidad, siendo la electroforesis en gel de agarosa y, más precisamente, el potencial zeta, las más recomendadas. En particular, la electroforesis en gel de agarosa suministra información sobre el grado de compactación que el vector macrocíclico ejerce sobre el pDNA. La Figura 5.33. muestra los geles de agarosa a tres diferentes relaciones  $(m_{CD} / m_{DNA})$  para cada uno de los CDplejos estudiados. El primer carril corresponde al pDNA libre, que servirá como control positivo, mientras que los carriles siguientes corresponden al complejo paCD-pDNA a valores de  $(m_{CD} / m_{DNA})$  entre 0,4 y 3 (números negros en los carriles 2-4). Las bandas de fluorescencia observadas en el primer carril corresponden a la emisión de la sonda GelRed intercalada entre los pares de bases de las formas enrollada y superenrollada del DNA libre, como se ha descrito en un capítulo anterior de esta Memoria. El hecho de que estas bandas de fluorescencia desaparezcan en presencia de paCD implica que el plásmido se encuentra compactado por el vector, por lo que no puede correr libremente por el carril cuando se aplica el campo eléctrico. Como se puede deducir de los resultados mostrados en la Figura 5.33, la electroneutralidad se encuentra a valores de  $(m_{CD} / m_{DNA})$  por debajo de 0,4, 0,7 y 0,5 para los complejos formados por ADM70-pDNA, AMD105-pDNA y PBO234-pDNA, respectivamente.



**Figura 5.33.** Geles de electroforesis a distintas composiciones  $m_{CD}/m_{DNA}$  para los CDplejos: a) ADM70-pDNA; b) ADM105-pDNA; y c) PBO234-pDNA.

Una vez estimadas las relaciones de electroneutralidad mediante electroforesis en gel de agarosa, se llevaron a cabo experimentos de potencial zeta con el objetivo de determinarlas con mayor precisión. La Figura 5.34 muestra los valores de potencial zeta en función de la relación de masas ( $m_{CD}/m_{DNA}$ ), cubriendo todo el intervalo en el que el pDNA ha sido eficazmente compactado, de acuerdo a los resultados previamente obtenidos (ver Figura 5.33). Se puede observar el típico hábito sigmoidal de este tipo de curvas para todos los complejos estudiados, mostrando una inversión de carga, de negativa a positiva, para una composición ( $m_{CD}/m_{DNA}$ ) dada que corresponde en cada caso a la relación de electroneutralidad buscada (potencial zeta = 0).



**Figura 5.34.** Gráficas de potencial zeta frente a  $m_{CD}/m_{DNA}$  para a) ctDNA y b) pDNA. En ambos casos a) y b) los cuadrados negros corresponden a ADM70, los círculos rojos a ADM105 y los triángulos azules a la PBO234.

En la Tabla 5.8. se resumen los valores obtenidos para la relación de electroneutralidad,  $(m_{CD}/m_{DNA})_{\Phi}$ , de los CDplejos formulados con cada una de las CDs y tanto con el ctDNA como con el pDNA. Con estos valores, y teniendo en cuenta el protocolo previamente descrito, se ha obtenido la carga efectiva para cada paCD y el pDNA,  $q_{eff,CD}^{+}$  y  $q_{eff,DNA}^{-}$ , las cuales aparecen recogidas en la Tabla 5.9



**Tabla 5.8.** Relaciones de isoneutralidad para los CDplejos formados por ADM70, ADM105 y PBO234 tanto con ctDNA como pDNA.

	ADM70-DNA	ADM105-DNA	PBO234-DNA
ctDNA	3,0	2,9	5,7
pDNA	0,19	0,38	0,25

Valores estimados con un error de 5%.

**Tabla 5.9.** Carga nominal y efectiva para cada paCD y pDNA

	ADM70	ADM105	PBO234
$q_{\text{nom,CD}}^+$	14	14	7
$q_{\text{eff,CD}}^+$	4,60	4,70	1,70
$q_{\text{eff,CD}}^+ / q_{\text{nom,CD}}^+$	0,33	0,33	0,25
$q_{\text{nominal,pDNA}}^- / \text{bp}$	-2	-2	-2
$q_{\text{eff,pDNA}}^- / \text{bp}$	-0,13	-0,26	-0,09
$q_{\text{eff,pDNA}}^- / q_{\text{nom,pDNA}}^-$	0,07	0,13	0,50
$\rho_{\text{eff}} / \rho_{\text{nom}}$	5,10	2,60	5,40

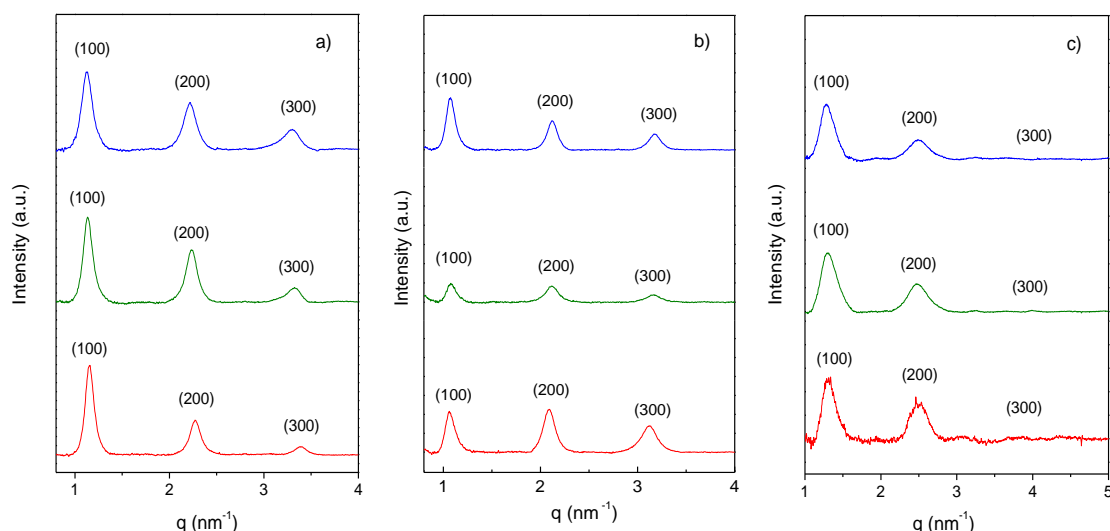
Valores estimados con un error de 5%.

Cabe destacar las diferencias encontradas entre las cargas nominales y efectivas, tanto en los vectores catiónicos como en el pDNA. Así, la carga neta total positiva disponible para la interacción con el pDNA es alrededor de un 33% de la carga nominal (que asume una protonación total de los grupos amino) para la ADM70 y ADM105, y de tan solo un 25 % en la PBO234. Este escenario es similar al encontrado para algunos vectores basados en polirotaxanos<sup>27</sup>, pero totalmente diferente al encontrado en vectores lipídicos catiónicos con grupos amino cuaternarios, para los que habitualmente las cargas efectivas y nominales coinciden dentro de un intervalo de 10% de error.<sup>2,12,28</sup>

Por otro lado, el plásmido aquí empleado parece encontrarse en configuración superenrollada en las condiciones experimentales empleadas, ya que la carga negativa disponible por par de bases es bastante inferior a la nominal (-2/bp), arrojando valores alrededor del 7%, 13% y 5% de la carga nominal cuando es compactado por la ADM70, ADM105 y la PBO234, respectivamente. Este comportamiento, encontrado a menudo en lipoplejos, confirma que el plásmido retiene un porcentaje importante de cationes sodio ( $\text{Na}^+$ ). *A priori*, esta es una característica favorable para el uso de vectores macrocíclicos como vehículos seguros y efectivos de ácidos nucleicos, ya que, cuanto más débil sea el carácter aniónico del pDNA, menor cantidad de vector catiónico necesitará para formar nanocomplejos, disminuyendo así el riesgo de citotoxicidad del vector. De hecho, a partir de los valores tabulados en la Tabla 5.9, y haciendo uso de la ecuación 5.9, se puede concluir que la relación de carga efectiva ( $\rho_{\text{eff}}$ ) es del orden de 5 veces (en el caso de ADM70 y PBO234) y 3 veces (en el caso de ADM105) mayor que las correspondientes relaciones de carga nominales.

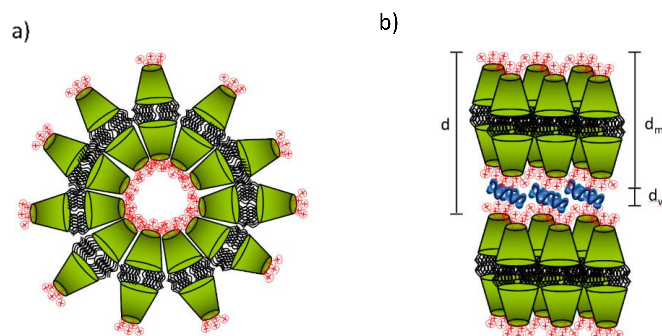
Tener información de la estructura de los complejos es de gran importancia para encontrar los mejores vectores no virales y promover su uso en terapia génica *in vivo*. Por ello, se ha llevado a cabo un completo estudio estructural de

los CDplejos, mediante técnicas como SAXS y crio-TEM, a composiciones a las cuales el complejo paCD-pDNA es potencialmente activo como vector, es decir a  $\rho_{eff} > 1$ . En la Figura 5.35. se pueden observar los difractogramas de SAXS ( $I$  frente a factor  $q$ ) para  $\rho_{eff} = 2, 4$  y  $8$ , con los índices de Miller indicados en cada uno de los picos. En todos los casos se puede indexar los máximos de difracción a una estructura de cristal líquido liotrópico lamelar ( $L_\alpha$ ), donde la distancia interlamelar ( $d$ ) está directamente relacionada con el factor  $q$ , mediante la ecuación, ( $d = 2\pi n / q_{hkl}$ ) siendo  $n$  el orden de difracción.



**Figura 5.35.** Difractogramas de SAXS para los CDplejos paCD-pDNA a diferentes  $\rho_{eff}$  : líneas rojas,  $\rho_{eff} = 2$ ; líneas verdes,  $\rho_{eff} = 4$ ; y líneas azules,  $\rho_{eff} = 8$ . (a) ADM70-pDNA, (b) ADM105-pDNA y (c) PBO234-pDNA.

Esta estructura lamelar podría explicarse considerando que las cadenas hexanoil unidas a la entrada más ancha de la  $\beta$ -CD promueven el autoensamblaje en forma de bicapa lipídica, similarmente a los vectores lipídicos anteriormente expuestos. De esta forma, las estructuras de los CDplejos podrían entenderse como bicapas alternantes de moléculas de paCDs, con un espesor dado por  $d_m$ , y una monocapa acuosa entre cada par de bicapas que contiene el pDNA superenrollado, cuyo espesor corresponderá a  $d_w$ , de manera que  $d = d_m + d_w$ . La Figura 5.36. (b) muestra un esquema de la estructura.



**Figura 5.36.** Dibujos esquemáticos de las paCDs formando vesículas y b) de la fase multilamelar de cristal liquido liotrópico ( $L_\alpha$ ).

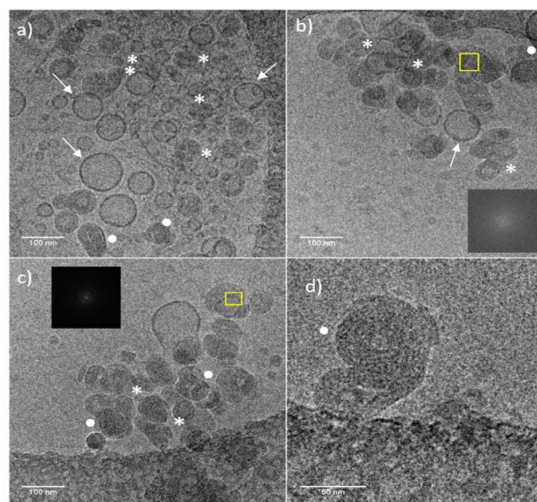
La Tabla 5.10 recoge los valores de  $d$ , calculados como un promedio a partir de los datos obtenidos de las reflexiones más intensas (100 y 200), a cada  $\rho_{eff}$ . Es destacable, que la periodicidad de la estructura permanece prácticamente constante a pesar de ir incrementando la cantidad de vector catiónico, para un contenido constante de pDNA (mayores  $\rho_{eff}$ ), y para los tres CDplejos estudiados. Sabiendo que los fragmentos de pDNA superenrollado necesitan un espesor de la monocapa acuosa en torno a  $d_w \sim 2-2,5$  nm para poder ser compactados tipo sándwich por las bicapas de paCDs, y considerando los valores de  $d$  previamente calculados, se podría estimar el espesor de la bicapa,  $d_m$ , alrededor de 3,1, 3,5 y 2,5 nm para los CDplejos ADM70-pDNA, ADM105-pDNA y PBO234-pDNA respectivamente. Es importante señalar que, teniendo en cuenta la longitud de las colas catiónicas y de las cadenas lipídicas, así como la profundidad de la cavidad de la  $\beta$ -ciclodextrina, los valores de  $d$ ,  $d_m$  y  $d_w$  obtenidos anteriormente serían compatibles con una estructura lamelar sólo si: i) las cadenas catiónicas unidas a la entrada más estrecha de la ciclodextrina estuvieran dispuestas de manera abierta, como si se tratara de una rama, para evitar repulsiones electrostáticas, y/o ii) las cadenas de tipo lipídico, unidas a la entrada más ancha de la  $\beta$ -CD, estuvieran entrecruzadas.

**Tabla 5.10** Valores de  $q$  ( $\text{nm}^{-1}$ ) y  $d$  (nm) de la fase lamelar para cada CDplejo a varios  $\rho_{eff}$ .

		ADM70	ADM105	PBO234
$\rho_{eff}$		$L_\alpha$	$L_\alpha$	$L_\alpha$
2	$q_{100}$	1,1	1,1	1,3
	$d_{100}$	5,6	5,9	4,9
	$q_{200}$	2,2	2,1	2,5
	$q_{300}$	3,3	3,1	-
4	$q_{100}$	1,13	1,1	1,3
	$d_{100}$	5,5	5,8	4,7
	$q_{200}$	2,2	2,1	2,5
	$q_{300}$	3,3	3,2	-
8	$q_{100}$	1,2	1,1	1,3
	$d_{100}$	5,4	5,8	4,8
	$q_{200}$	2,3	2,1	2,5
	$q_{300}$	3,4	3,2	-

Valores estimados con un error de 5%.

Para confirmar esta estructura lamelar, se han llevado a cabo experimentos complementarios de crio-TEM para  $\rho_{eff} = 4$ . En la Figura 5.37 se muestra una selección de micrografías correspondientes al complejo ADM105-pDNA, a modo de ejemplo representativo del conjunto de imágenes obtenido. El patrón de autoasociación multilamelar encontrado previamente en SAXS también se observa en estas micrografías. De hecho, se pueden encontrar tres tipos de nanoestructuras diferentes en coexistencia: (i) CDplejos con un perfil multilamelar bien definido, agregados en forma de clúster (tipo CT, señalados con un asterisco en la figura); (ii) CDplejos con un patrón de organización tipo huella dactilar (nanoagregados FT, marcados con un círculo blanco), pudiéndose ver una imagen ampliada en el panel (d); y iii) autoagregados tipo vesícula de moléculas de paCD sin pDNA compactado (indicado mediante flechas blancas). El hecho de que aparezcan estos últimos agregados sin pDNA compactado, tiene su explicación en que estos experimentos se han realizado con un exceso de compuesto catiónico ( $\rho_{eff} = 4$ ), y es este exceso de moléculas de paCD el que tiende a formar vesículas esféricas unilamelares. Se puede inferir que estas vesículas interactúan con el pDNA a través de fuertes interacciones electrostáticas, y tienden a agregarse en fases multilamelares (bien sea tipo CT o tipo FP) manteniendo el pDNA en la monocapa acuosa entre las dos bicapas. En la Figura 5.36 se observan los dibujos esquemáticos para ambos nanoagregados: a) vesículas esféricas unilamelares en ausencia de pDNA, y b) CDplejos multilamelares en presencia de pDNA. En las estructuras tipo CT, las bicapas se pueden deformar ligeramente al compactar el pDNA entre bicapas adyacentes, que mantienen, no obstante, siempre la morfología. Sin embargo, en el caso de las estructuras tipo FP, las bicapas tienden a romperse debido, probablemente, a una interacción más favorable paCD-pDNA. Este escenario ya se había descrito en complejos lípido catiónico-pDNA.<sup>4,12</sup> Algunas de las estructuras multilamelares de la Figura 5.37. (y otras no mostradas en esta figura) fueron sometidas a un análisis FFT por transformada de Fourier (FFT, *Fast Fourier Transform*). A modo de ejemplos representativos, se pueden ver los resultados de este análisis en los recuadros de los paneles (b) y (c), donde se observa un perfil FFT típicamente correspondiente a una estructura lamelar.



**Figura 5.37.** Selección de micrografías de crioTEM del complejo ADM105-pDNA para  $\rho_{eff} = 4$ .

En conclusión, el conjunto de información obtenida a partir de los estudios electroquímico y estructural pone en evidencia que los CDplejos estudiados se autoorganizan en fases multilamelares  $L_\alpha$  independientemente de  $\rho_{eff}$ , aunque los mejores niveles de compactación del pDNA se consiguen a  $\rho_{eff} = 4$ . Además, no debe olvidarse que los CDplejos deben tener una carga neta positiva para interactuar con la membrana celular (es decir, con  $\rho_{eff} > 1$ ), pero con un

contenido en vector catiónico lo más bajo posible para disminuir su citotoxicidad. Por tanto, todas estas consideraciones parecen apuntar al valor  $\rho_{eff} = 4$  como una relación de cargas potencialmente adecuada para llevar a cabo tanto el estudio proteómico en presencia de suero humano, como los experimentos de transfección celular.

Una vez en contacto con un medio biológico, en este caso con suero humano (HP), los CDplejos adsorben las proteínas plasmáticas en función del tiempo. En un primer momento, las proteínas más abundantes se unirán fuertemente a la superficie del vector, siendo progresivamente sustituidas a medida que pasa el tiempo por las de mayor afinidad por la superficie de los CDplejos. Una vez alcanzado el equilibrio (normalmente al cabo de 1 h), la superficie del CDplejo estará rodeada de una corona de proteínas constituida por una primera capa de proteínas de larga asociación, lo que se conoce como “corona dura” (*hard corona*, HC) y que dotará al CDplejo de su identidad biológica, además de una “corona blanda” (*soft corona*, SC), formada por proteínas en intercambio dinámico con el medio circundante.

En este estudio, tanto las paCDs como los CDplejos que forman con el pDNA, se han incubado durante una hora con suero humano, y posteriormente se ha confirmado la formación de la corona de proteínas mediante experimentos de potencial zeta y DLS de los CDplejos en ausencia y presencia de suero humano (HP). Los datos recogidos en la Tabla 5.11 muestran que los CDplejos en ausencia de corona de proteínas están cargados positivamente (potencial zeta en torno a +30 mV), con un radio hidrodinámico de unos 114 nm en el caso del CDplejo ADM70-pDNA y en torno a 150 nm para los otros dos CDplejos. Después de una hora de incubación con suero, se observan cambios significativos que apuntan a la formación de la corona: i) un claro incremento en el tamaño de los complejos (el diámetro hidrodinámico  $D_h$  aumenta unos 40-45 nm en los tres casos); y ii) un marcado descenso del potencial zeta (de +30 mV a -17 mV), con una clara inversión de carga, de positiva a negativa. Estas evidencias son claramente compatibles con la formación de una corona de proteínas con un espesor de aproximadamente 20 nm, constituida principalmente por proteínas cargadas negativamente (i.e.  $pI < 7$ ), localizadas en la superficie del CDplejo. También cabe destacar que los CDplejos ADM70-pDNA, tanto en ausencia como en presencia de HP, muestran una mayor estabilidad y homogeneidad en el tamaño (véanse los valores de polidispersidad, PDI) con respecto a los CDplejos de ADM105 y PBO234.

**Tabla 5.11.** Diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ), índice de polidispersidad (PDI) y valores de potencial zeta para los complejo ADM70-pDNA, ADM105-pDNA y PBO234-pDNA a  $\rho_{eff} = 4$ , antes y después de su exposición a suero humano (1h de incubación).

	$D_h$ (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)
<b>ADM70</b> -pDNA	114 ± 6	0,21 ± 0,01	29,8 ± 1,2
<b>ADM70</b> -pDNA + HP	153 ± 8	0,34 ± 0,03	-17,4 ± 2,5
<b>ADM105</b> -pDNA	149 ± 15	0,41 ± 0,08	31,7 ± 2,2
<b>ADM105</b> -pDNA + HP	191 ± 18	0,64 ± 0,13	-16,3 ± 2,5
<b>PBO234</b> -pDNA	155 ± 12	0,53 ± 0,09	28,4 ± 1,4
<b>PBO234</b> -pDNA + HP	203 ± 28	0,66 ± 0,16	-18 ± 7

Una vez demostrada la formación de la corona, resulta muy conveniente analizar su composición, para lo que se ha recurrido a una técnica clave en estudios proteómicos, que combina una cromatografía en fase líquida con la espectrometría de masas (NanoLC-MS/MS). Estos experimentos sólo pudieron llevarse a cabo para las paCDs ADM70 y ADM105 y sus correspondientes CDplejos, ya que la incubación con suero de PBO234 y PBO234-pDNA produce una corona de proteínas fuertemente unidas que no se ha podido solubilizar en el intervalo de concentración requerido por los protocolos establecidos.

Las Tablas 5.12 y 5.13 recogen las 25 proteínas más abundantes encontradas en la corona de la ADM70 y ADM105, respectivamente, en ausencia y presencia de pDNA. A su vez, estas proteínas se han clasificado según su peso molecular (MW) y su punto isoeléctrico (pI) en la Figura 5.38.

En ausencia de pDNA, la corona de proteínas de la ADM70 está formada principalmente por proteínas con peso molecular entre 60-80 kDa (RPA~23%) y 150-300 kDa (RPA~11%). En la corona de proteínas del CDplejo ADM70-pDNA, el porcentaje de proteínas con peso molecular entre 60-80 kDa es prácticamente el mismo (RPA~21%), mientras que se ha observado un ligero descenso de aquéllas con un peso molecular alto (150-300 kDa, RPA de 11 a 8 %) y un incremento en las que están por debajo de 20 kDa (RPA de 7 a 11%).

Los experimentos llevados a cabo para la ADM105, han mostrado que las proteínas con pesos moleculares entre 60-80 kDa tienen una abundancia relativa en torno al 28%, indistintamente en presencia y ausencia de pDNA, mientras que la RPA para proteínas con pesos moleculares entre 150-300 kDa aumenta de un 8 % para la ADM105 a un 14% para el CDplejo ADM105-pDNA. Para ambas paCDs, con y sin pDNA, la corona está constituida por proteínas con un pI entre 5 y 6 (33% para ADM70 y 44% para ADM105), lo que significa que las proteínas adsorbidas tienen mayoritariamente carga negativa (pI < 7), en total concordancia con los resultados de potencial zeta previamente comentados. Estos resultados apoyan la idea de que las fuerzas electrostáticas intermoleculares dirigen la interacción no covalente entre proteínas y vectores catiónicos.

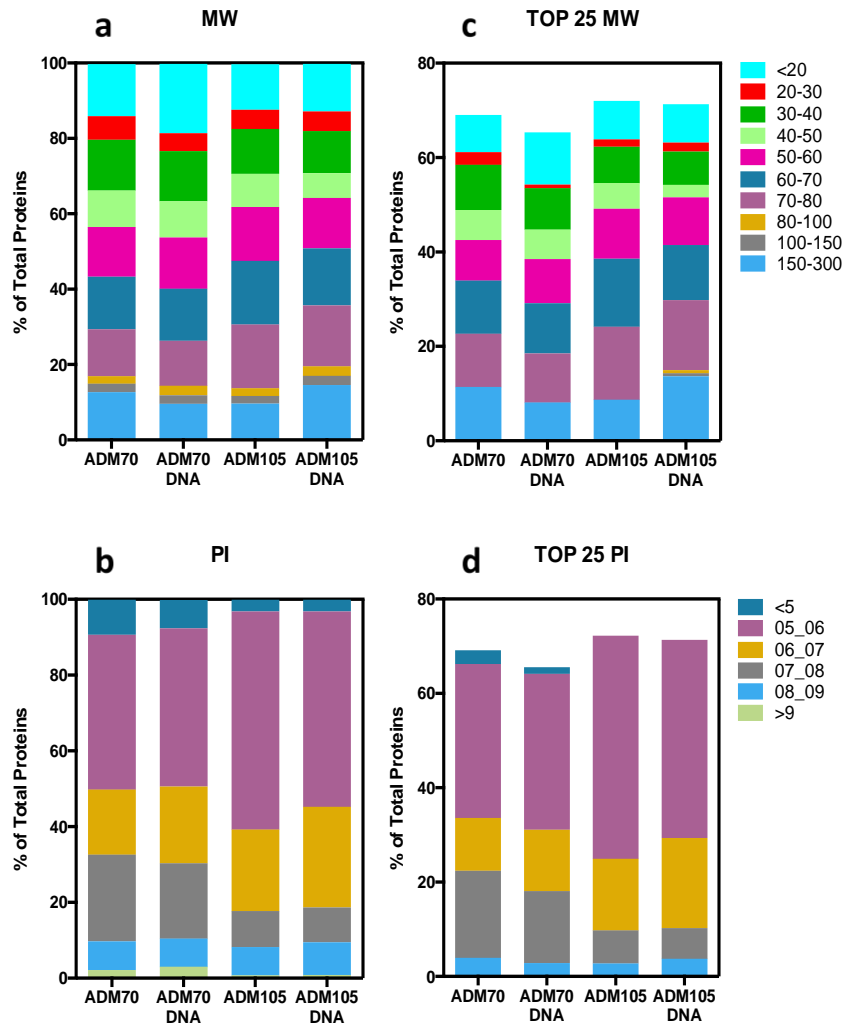
**Tabla 5.12.** Las 25 proteínas más abundantes identificadas en la corona de proteínas de la ADM70 en ausencia y presencia de pDNA. RPA: abundancia relativa de proteínas. Las proteínas comunes aparecen subrayadas en gris.

TOP 25							
ADM70				ADM70-pDNA			
#	Identified proteins	RPA (%)	SD (%)	#	Identified proteins	RPA (%)	SD (%)
1	Prothrombin	9.33	0.37	1	Prothrombin	9.58	0.71
2	C4b-binding protein alpha chain	7.30	0.45	2	Vitronectin	5.34	0.35
3	Vitronectin	4.98	0.42	3	C4b-binding protein alpha chain	4.92	0.22
4	Complement C4-B	4.68	0.35	4	Serum albumin	4.89	1.22
5	Complement C4-A	4.36	0.33	5	Apolipoprotein A-I	4.85	0.72
6	Ig kappa chain C region	4.10	0.54	6	Ig kappa chain C region	4.66	0.27
7	Apolipoprotein A-I	4.08	0.16	7	Apolipoprotein A-IV	4.11	0.40
8	Apolipoprotein A-IV	3.20	0.18	8	Apolipoprotein A-II	3.50	0.92
9	Apolipoprotein E	3.07	0.22	9	Complement C4-B	3.44	0.27
10	Apolipoprotein A-II	2.70	0.35	10	Complement C4-A	3.16	0.23
11	Serum albumin	2.64	0.51	11	Ig lambda-2 chain C regions	2.11	0.24
12	Complement C3	2.37	0.12	12	Apolipoprotein E	1.97	0.02
13	Vitamin K-dependent protein S	2.01	0.14	13	Fibrinogen beta chain	1.65	0.09
14	C4b-binding protein beta chain	1.57	0.28	14	Complement C3	1.57	0.05
15	Ig gamma-1 chain C region	1.42	0.08	15	Clusterin	1.54	0.09
16	Fibrinogen beta chain	1.39	0.06	16	Ig gamma-1 chain C region	1.19	0.07
17	Serum paraoxonase/arylesterase 1	1.37	0.15	17	Vitamin K-dependent protein S	0.91	0.05
18	Hyaluronan-binding protein 2	1.36	0.03	18	Hyaluronan-binding protein 2	0.84	0.05
19	Clusterin	1.25	0.08	19	Fibrinogen gamma chain	0.84	0.08
20	Complement C1q subcomponent subunit B	1.12	0.27	20	Ig gamma-3 chain C region	0.83	0.04
21	Ig lambda-2 chain C regions	1.10	0.11	21	Apolipoprotein C-III	0.82	0.07
22	Ig gamma-2 chain C region	1.03	0.14	22	Ig gamma-2 chain C region	0.79	0.05
23	Actin. cytoplasmic 2	0.96	0.12	23	C4b-binding protein beta chain	0.77	0.03
24	Coagulation factor X	0.94	0.06	24	Ig mu chain C region	0.68	0.06
25	Ig mu chain C region	0.87	0.01	25	Serum paraoxonase/arylesterase 1	0.65	0.09

**Tabla 5.13.** Las 25 proteínas más abundantes identificadas en la corona de proteínas de la ADM105 en ausencia y presencia de pDNA. RPA: abundancia relativa de proteínas. Las proteínas comunes aparecen subrayadas en gris.

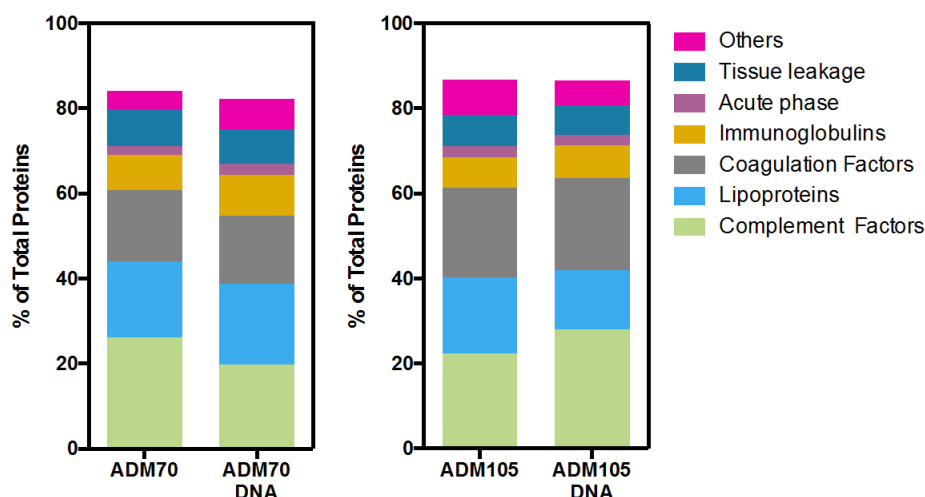
TOP 25							
ADM105				ADM105-pDNA			
#	Identified proteins	RPA (%)	SD (%)	#	Identified proteins	RPA (%)	SD (%)
1	Prothrombin	13.18	2.25	1	Prothrombin	12.65	0.10
2	C4b-binding protein alpha chain	7.02	1.39	2	C4b-binding protein alpha chain	6.54	0.08
3	Serum albumin	5.70	0.82	3	Complement C4-B	4.98	0.09
4	Vitronectin	5.37	0.94	4	Vitronectin	4.87	0.02
5	Apolipoprotein A-I	3.63	0.53	5	Complement C4-A	4.84	0.11
6	Complement C4-B	3.61	0.74	6	Complement C3	3.84	0.05
7	Apolipoprotein A-IV	3.57	0.57	7	Serum albumin	3.37	0.14
8	Complement C4-A	3.48	0.71	8	Ig kappa chain C region	2.94	0.16
9	Ig kappa chain C region	2.80	0.54	9	Apolipoprotein A-I	2.82	0.25
10	Apolipoprotein E	2.70	0.45	10	Apolipoprotein A-IV	2.68	0.03
11	Vitamin K-dependent protein S	2.40	0.44	11	Fibrinogen beta chain	2.49	0.06
12	Clusterin	2.02	0.38	12	Vitamin K-dependent protein S	2.22	0.06
13	Apolipoprotein A-II	1.92	0.31	13	Apolipoprotein C-III	2.16	0.17
14	Apolipoprotein C-III	1.68	0.29	14	Apolipoprotein E	2.14	0.13
15	Hyaluronan-binding protein 2	1.68	0.30	15	C4b-binding protein beta chain	1.90	0.26
16	Complement C3	1.63	0.28	16	Hyaluronan-binding protein 2	1.77	0.06
17	C4b-binding protein beta chain	1.59	0.48	17	Ig lambda-2 chain C regions	1.61	0.12
18	Fibrinogen beta chain	1.40	0.24	18	Apolipoprotein A-II	1.42	0.16
19	Ig gamma-1 chain C region	1.37	0.22	19	Ig gamma-1 chain C region	1.23	0.03
20	Ig mu chain C region	1.09	0.23	20	Fibrinogen gamma chain	1.16	0.01
21	Ig lambda-2 chain C regions	0.93	0.17	21	Clusterin	0.92	0.06
22	Coagulation factor X	0.92	0.19	22	Protein AMBP	0.84	0.05
23	Fibrinogen gamma chain	0.91	0.16	23	Complement factor H	0.67	0.00
24	Hemoglobin subunit beta	0.86	0.18	24	Coagulation factor IX	0.66	0.03
25	Ig mu heavy chain disease protein	0.83	0.34	25	Fibrinogen alpha chain	0.66	0.03





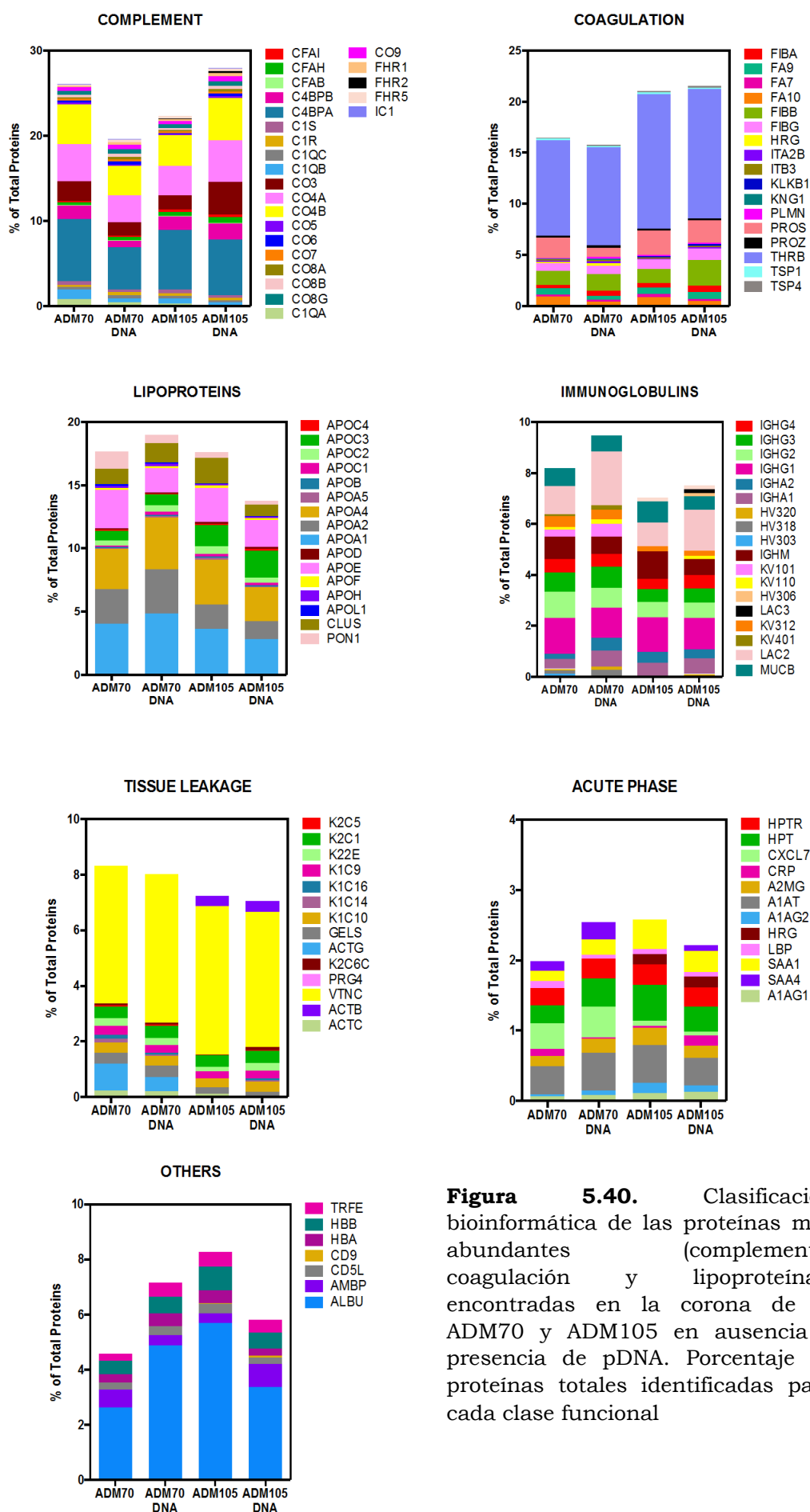
**Figura 5.38** Porcentaje de proteínas totales de la corona de ADM70 y ADM105 en ausencia y presencia pDNA, clasificadas según su peso molecular, MW (a), y su punto isoelectrico, pI (b). Porcentaje de cada una de las 25 proteínas más abundantes que forman la corona clasificadas según su peso molecular, MW (c), y su punto isoelectrico, pI (d).

También se ha llevado a cabo una clasificación de las proteínas de la corona según su función fisiológica (Figuras 5.39, en general, y 5.40, en detalle). Para los nanoagregados ADM70 y ADM105 y para los correspondientes CDplejos, las proteínas más abundantes han sido las de complemento, lipoproteínas y de coagulación, mientras que las inmunoglobulinas, la proteínas de permeabilidad celular y las proteínas de fase aguda constituyen una fracción menor. Las proteínas de complemento promueven la eliminación del CDplejo del sistema circulatorio, su acumulación en el hígado y bazo y están implicadas en los procesos de respuesta inmunitaria. Las proteínas de coagulación participan en procesos de coagulación, así como las lipoproteínas afectan al transporte intracelular.



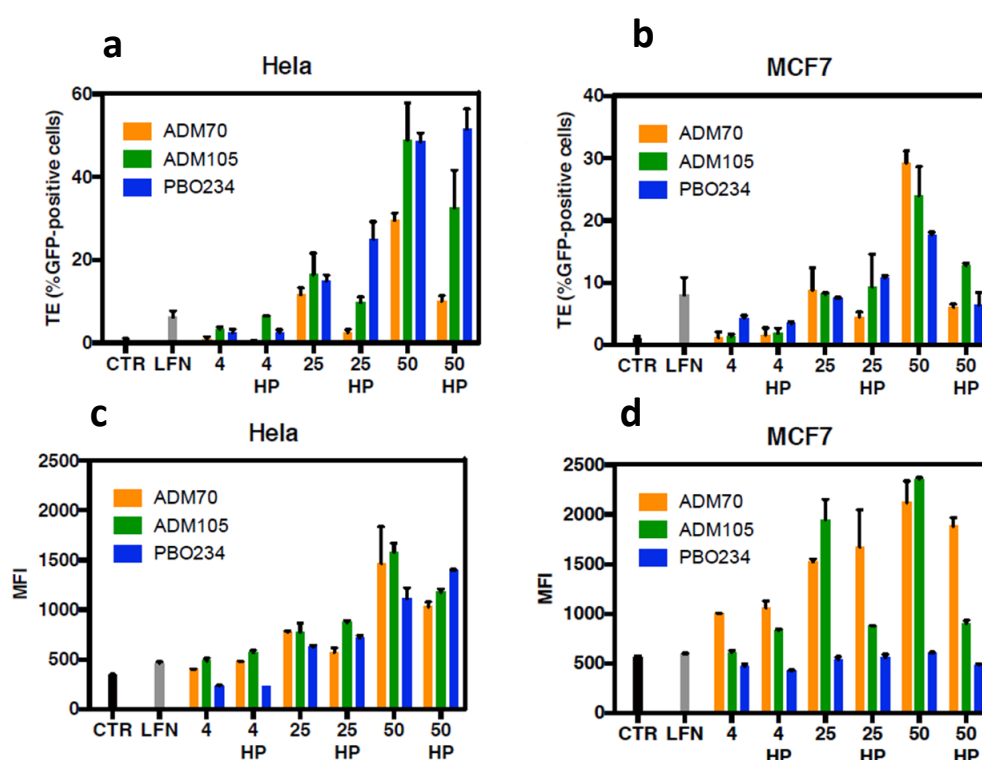
**Figura 5.39.** Porcentaje de proteínas encontradas en la corona de ADM70 y ADM105 en ausencia y presencia pDNA, clasificadas según su la función fisiológica.

La Figura 5.40 reporta la clasificación bioinformática detallada de las proteínas de la corona en términos del porcentaje de proteínas total, identificadas para cada clase funcional. Como se puede inferir de estos resultados, la protrombina presenta el porcentaje más alto para todas las paCDs en ausencia de pDNA, seguidas de la C4BPA, vitronectina, albúmina y APOA1. En el caso de los CDplejos, la tendencia es similar, aunque la abundancia de albúmina se ve más afectada por el tipo de paCD y/o la ausencia/presencia de pDNA. Cabe mencionar que la protrombina está implicada en procesos de coagulación, la C4BPA controla la activación de la vía clásica del complemento, la vitronectina es un receptor de células cancerígenas, la albúmina prolonga la circulación del CDplejo en el torrente sanguíneo y facilita la entrada a través de barreras biológicas, mientras que la APOA1 es la proteína más abundante dentro de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y puede usarse como ligando.



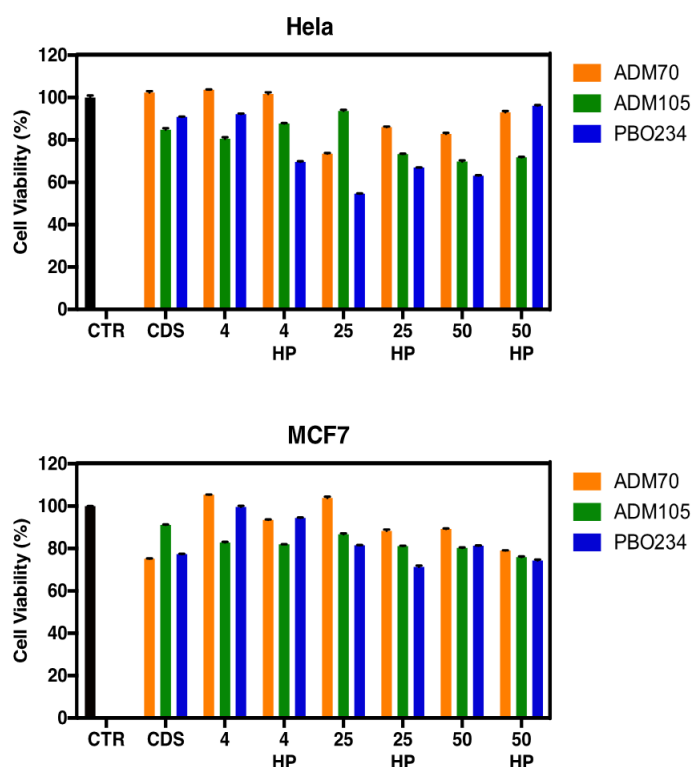
**Figura 5.40.** Clasificación bioinformática de las proteínas más abundantes (complemento, coagulación y lipoproteínas) encontradas en la corona de la ADM70 y ADM105 en ausencia y presencia de pDNA. Porcentaje de proteínas totales identificadas para cada clase funcional

Por último, se ha evaluado la eficacia de transfección (TE) así como la viabilidad celular de los CDplejos en las líneas celulares de cáncer HeLa y MCF-7, a  $\rho_{eff} = 4$ , en ausencia y presencia de suero humano (HP). En todos los experimentos, se ha usado Lipofectamina como control positivo. En la Figura 5.41 se muestran los resultados de TE en términos del % de GFP expresada (recuadros a-b) e intensidad de fluorescencia media (MFI) (recuadros c-d). Altos valores de % de GFP son indicativos de que hay un porcentaje significativo de población celular que expresa la proteína GFP, mientras que altos valores de MFI muestran un alto nivel de expresión de esta proteína GFP por célula en promedio, como resultado del nivel de copias de pDNA transfectado, transcrito y traducido por célula.



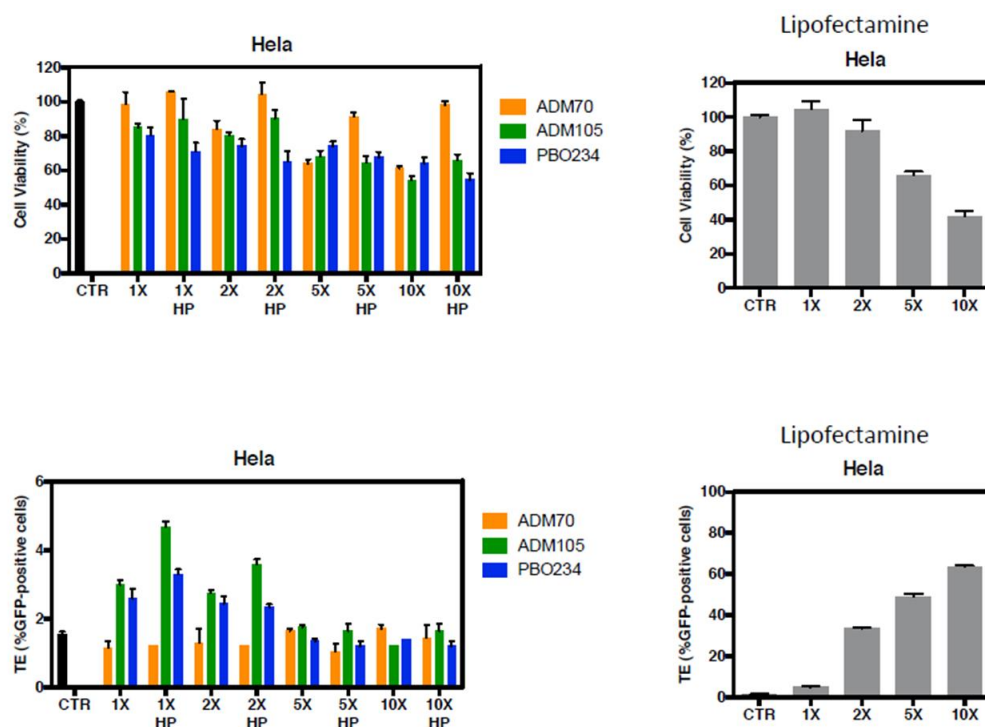
**Figura 5.41.** Valores de eficacia de transfección (TE) de los CDplejos paCDs-pDNA en términos del porcentaje de GFP expresado (paneles a-b) y de la intensidad media de fluorescencia (MFI) (paneles c-d), a  $\rho_{eff} = 4, 25$  y  $50$ , en ausencia y presencia de suero humano (HP), en las líneas celulares HeLa y MCF-7. CTR: células solas. LFN: Lipofectamina, control positivo.

A menudo, los vectores génicos altamente eficientes transfectando células adolecen de presentar también altos valores de citotoxicidad. Para evaluar si las formulaciones con paCDs utilizadas en esta Tesis son tóxicas o no, se trataron las líneas celulares HeLa y MCF-7 con los correspondientes CDplejos, para posteriormente someterlas a un ensayo de reducción MTT, cuyos resultados se muestran, de manera resumida, en la Figura 5.42. Es destacable que los CDplejos a  $\rho_{eff} = 4$ , transfectan las células de manera tan poco eficiente como el control, en términos de MFI, y ligeramente peor, en lo que respecta a %GFP (Figura 5.41). No obstante, la viabilidad celular ha sido razonablemente buena (70-100%) a esta  $\rho_{eff}$ , tanto en ausencia como en presencia de suero humano (Figura 5.42).



**Figura 5.42.** Viabilidad celular de los CDplejos paCDS-pDNA a  $\rho_{eff} = 4, 25$  and  $50$  para las líneas celulares HeLa y MCF-7 en presencia y ausencia de suero humano (HP). CTR: células solas. CDS: células en presencia de paCDS sin pDNA.

Ante los bajos niveles de transfección obtenidos (Figura 5.41), diseñamos dos posibles estrategias en un intento de mejorar estos resultados: i) por un lado, decidimos incrementar la concentración de CDplejo por célula, manteniendo  $\rho_{eff} = 4$ , ya que se ha publicado recientemente<sup>29</sup> que un incremento en este parámetro (concentración de vector/célula) favorece la transfección; o ii) por otro lado, evaluamos si incrementado  $\rho_{eff}$  se mejoraban los niveles de TE, aun siendo conscientes del riesgo de aumentar paralelamente los niveles de citotoxicidad. La Figura 5.43 muestra los resultados obtenidos trabajando con la primera de las aproximaciones. Como puede verse, incrementando la concentración de CDplejo por célula (2X, 5X e incluso 10X), los niveles de TE son incluso más bajos que los previamente obtenidos (1X), en contraste con el control Lipofectamina para el cual un incremento en la dosis del CDplejo, provoca una clara mejora de los resultados de TE para la línea celular HeLa. Además, los niveles de citotoxicidad muestran un ligero incremento cuando se aumenta la concentración CDplejo/célula, tanto para la muestra como para el control. Esta combinación poco propicia (disminución de TE e incremento de la citotoxicidad) revela claramente que la primera estrategia debe ser descartada para los CDplejos aquí estudiados.

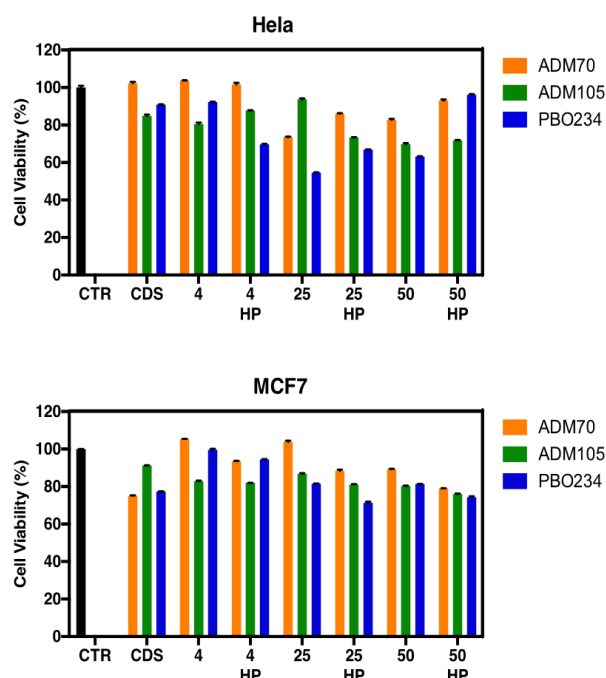


**Figura 5.43.** Viabilidad celular y eficacia de transfección (TE) de los CDplejos paCD-pDNA a  $\rho_{eff} = 4$ , para la línea celular HeLa, en ausencia y presencia de suero humano (HP), a varias concentraciones de CDplejos por célula: 2X, 5X y 10X, comparado con 1X. CTR: células solas. También se muestran todos los resultados para los lipoplejos Lipofectamina-pDNA como control positivo.

La Figura 5.41, muestra los resultados obtenidos con la segunda aproximación, es decir, un incremento de la  $\rho_{eff}$  a 25 y 50, junto con los previamente comentados a  $\rho_{eff} = 4$ . Como puede verse, las tres paCDs han sido capaces de transfectar el pDNA de manera más eficaz de lo que lo ha hecho la Lipofectamina (mejores valores de %GFP y MFI) a valores de  $\rho_{eff}$  altos, tanto en ausencia como en presencia de suero (HP). En ausencia de suero y a alto  $\rho_{eff}$  (Figura 5.41 c-d), los valores de MFI siguen la tendencia ADM70-pDNA  $\approx$  ADM105-pDNA > PBO234-pDNA, independientemente de la línea celular, aunque la superioridad de las ADMs es más evidente en la línea MCF-7. Sin embargo, se ha encontrado una cierta disminución de la eficacia de transfección en presencia de suero humano, lo cual podría deberse a una reducción del escape endosomal en el citoplasma de las células. De hecho, mientras que la presencia de suero humano (HP) puede promover la interacción con receptores celulares, la fusión con la membrana endosomal podría ser, al menos en parte, dificultada por la capa rica en proteínas que hay adsorbida sobre la superficie del vector. No obstante, algunas proteínas constituyentes de la corona, podrían impulsar el complejo hacia compartimentos celulares de carácter ácido (por ejemplo, lisosomas) donde el material genético podría degradarse. A pesar de la disminución de la eficacia de transfección originada por la presencia de suero, los CDplejos formados por ADMs, y en particular la corona de proteínas formada alrededor del CDplejo ADM70-pDNA, han sido capaces de originar mejores resultados de MFI (principalmente para la línea celular MCF-7). Esto apunta a que, aunque la corona de proteínas pudiera ser probablemente un obstáculo para el proceso de captación celular, los pasos intracelulares

necesarios para la expresión de las proteínas, incluidos el escape endosomal, llegada al núcleo y liberación del pDNA, están particularmente favorecidos por la corona de proteínas que rodea al complejo ADM70-pDNA.

Por otro lado, como se indica en la Figura 5.44, el incremento de  $\rho_{eff}$  de 4 a 50, parece disminuir ligeramente la viabilidad de la línea celular HeLa, en ausencia de HP, mientras que no hay una reducción apreciable en la MCF-7. En presencia de la corona de proteínas, la viabilidad celular de ambos tipos de células no ha disminuido significativamente. Sin embargo, hay que destacar que casi todos los valores están alrededor de o superan el 80%, considerado como una valor umbral límite. No obstante, la interpretación del efecto de la corona de proteínas en la viabilidad celular debe hacerse con precaución. El que la corona de proteínas reduzca la viabilidad celular o, por el contrario, proteja las células puede ser debido a la composición específica de la corona, y, por consiguiente, a la compleja relación entre la composición de la corona y el procesamiento de los vectores a cargo de la maquinaria celular.<sup>30</sup> Además, en ausencia de experimentos *in vivo*, la evaluación de la composición de la corona de proteínas, aunque implica una importante mejora con respecto a utilizar únicamente experimentos SDS PAGE, no permite obtener conclusiones inequívocas sobre el futuro en aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, direccionalidad, biodistribución, citotoxicidad). De hecho, la mayoría de los trabajos de la literatura se centran en analizar el mapa de distribución de puntos de interacción de las proteínas constitutivas de la PC. En ausencia de este tipo de información, la valoración sobre el papel potencial de la corona de proteínas debe hacerse, pero dentro de unos límites, puesto que, en caso contrario, podría caerse en un alto grado de especulación.



**Figura 5.44.** Viabilidad celular de los CDplejos paCDS-pDNA a  $\rho_{eff}$  = 4, 25 y 50 para células HeLa y MCF-7, en ausencia y presencia de suero humano (HP). CTR: células solas. CDS: células en presencia de las paCDs sin pDNA.

Considerando todas las evidencias experimentales comentadas, se podría concluir que las paCDs ADM70 y ADM105 se muestran como prometedores vectores no virales de pDNA, superiores claramente en sus prestaciones a la formulación constituida por PBO234 y también al control universal Lipofectamina. Las diferencias encontradas en la eficacia de transfección pueden atribuirse a diferencias en las rutas de internalización celular. De hecho, está reportado en la literatura<sup>31</sup> que los CDplejos son internalizados en las células mediante procesos de endocitosis mediados bien por caveolina o clatrina, pero sólo el primero de estos mecanismos es productivo a nivel de expresión proteica. Precisando aún más esta conclusión, se podría incluso decir que los CDplejos obtenidos a partir de la ADM70 parecen mostrar las prestaciones más prometedoras para aplicaciones de terapia génica *in vitro*: alta estabilidad en ausencia y presencia de suero humano, distribución de tamaño homogénea, bajo impacto (con respecto a las otras paCDs) de la corona de proteínas en la capacidad de los CDplejos para mediar eficazmente en la expresión eficaz de las proteínas *in cellulo*, y muy baja citotoxicidad incluso a valores de  $\rho_{eff}$  altos, e independientemente de la presencia o ausencia de HP. Estas características están en concordancia con la superioridad previamente observada de las ADM70 en estudios de transfección *in vivo*<sup>32,33</sup>. El grueso de las evidencias biofísicas y bioquímicas obtenidas en esta Tesis aporta una vía para la caracterización rigurosa de vectores con pDNA molecular para poder ser optimizados y utilizados en aplicaciones de terapia génica. Ampliar la actual base de datos de vectores génicos no virales con el objetivo de diseñar racionalmente una nueva generación de posibles candidatos debe fundamentarse en un conocimiento detallado de las propiedades electroquímicas y estructurales de sus complejos con los ácidos nucleicos, de la composición de su corona de proteínas (cuando se exponen a fluidos biológicos), y de su eficacia transfectando células vivas en diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo*. Precisamente, el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral va en esa dirección.

En conclusión, este estudio global utilizando vectores macrocíclicos con matriz lipídica, ha tenido como objetivo proporcionar nuevos enfoques en el estudio de los procesos que gobiernan la complejación del pDNA por vectores monodisperos de la familia de las paCDs, en un intento por entender la correlación existente entre la estructura molecular y su capacidad para transfectar células vivas de una manera eficaz y segura. Con este propósito, se han estudiado con profundidad tres compuestos basados en CDs (ADM70, ADM105 y PBO234), como potenciales nanovectores del plásmido pEGFP-C3 que codifica para la expresión de la GFP en las líneas celulares HeLa y MCF-7, tanto en ausencia como en presencia de suero humano. En un primer nivel de organización, la estructura molecular del vector influye en la carga efectiva disponible para interaccionar con el plásmido, así como en la carga efectiva del plásmido en los nanoagregados. De hecho, los estudios de potencial zeta han revelado que las cargas efectivas son menores que las nominales, tanto para los vectores (paCDs) (alrededor de un 30% para las ADMs y 25% para PBO234), como para el plásmido, que ofrece un menor porcentaje de su carga negativa (menos de un 15%) cuando es compactado por el nanovector. Este hallazgo es potencialmente favorable ya que, cuanto menor sea el carácter aniónico del DNA, menor cantidad de vector catiónico será necesaria para formular los



nanocomplejos, lo cual implica una disminución en la citotoxicidad del vector y un incremento en su potencial como vector seguro y eficaz de los ácidos nucleicos. Por otro lado, SAXS y crio-TEM han mostrado que los tres CDplejos se estructuran en fases multilamelares ( $L_\alpha$ ) de cristal líquido liotrópico. Se distinguen, no obstante, dos fases multilamelares diferentes en las micrografías de crio-TEM, unas tipo clúster (CT) y otras tipo huella dactilar (FP), en coexistencia con vesículas unilamelares de nanoagregados de paCDs en exceso, sin pDNA compactado. Aunque la anfifilicidad facial característica de las paCDs estudiadas (estructuras tipo Janus) parece garantizar el patrón multilamellar observado en todos los CDplejos paCD-pDNA estudiados, su estabilidad y homogeneidad puede ser significativamente diferente dependiendo de la topología del dominio multivalente catiónico de la entidad paCD. En presencia de suero humano, tiene lugar un segundo nivel de organización que implica a la interacción del CDplejo con las proteínas del suero, dando lugar a la formación de nanoentidades multicomponente provistas de una corona de proteínas que depende de la paCD implicada. La caracterización de la corona de proteínas ha dado lugar a interesantes conclusiones. Las proteínas adsorbidas tienen principalmente carga negativa en todos los casos ( $pI < 7$ ), apuntando a las interacciones electrostáticas como fuerzas no covalentes responsables de la interacción entre proteínas y vectores catiónicos. Las proteínas de complemento, lipoproteínas y de coagulación han resultado ser las más abundantes en la corona de las proteínas de las paCDs y sus correspondientes CDplejos, mientras que las inmunoglobulinas, las proteínas de permeabilidad celular y las de fase aguda constituyen una fracción menor. A relaciones de carga efectiva moderadas-altas ( $\rho_{eff} = 25$  y  $50$ ), los CDplejos sin corona de proteínas transfectan tanto las células HeLa como las MCF-7 de manera más eficazmente que la Lipofectamina, obteniéndose además viabilidades celulares en el intervalo entre 80-100%. Estos niveles de eficacia de transfección (TE) disminuyen ligeramente en presencia de medios biológicos (HP), pero, en cualquier caso, siempre son superiores a los obtenidos con el control Lipofectamina. Sin embargo, el efecto de la corona de proteínas en la viabilidad celular de los CDplejos no tiene una interpretación fácil. Probablemente, la composición específica de la corona, y, por consiguiente, su complejo efecto en el procesado del nanovector a cargo de la maquinaria celular juegan un papel crucial, aunque se necesitaría un mapeado de sitios de interacción específicos en la corona de proteínas, para ir más allá en nuestras conclusiones. En todo caso, el grueso de las evidencias biofísicas y bioquímicas obtenidas en esta Tesis Doctoral, nos permite concluir que las tres paCDs propuestas, pueden ser consideradas como nanovectores de ácidos nucleicos potencialmente eficaces y seguros *in vitro* e incluso prometedores nanovectores génicos *in vivo*. Yendo más allá, entre las tres paCDs estudiadas en esta Tesis, la ADM70 parece mostrar las características más favorables para aplicaciones *in vitro* en las que se requiera la presencia de suero humano, lo cual concuerda muy bien con la superioridad de esta paCD en experimentos *in vivo* previos.

## 5.2. Vectores transportadores de siRNA: silenciamiento génico.

### 5.2.1. Vectores catiónicos gemini $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/DOPE$ .

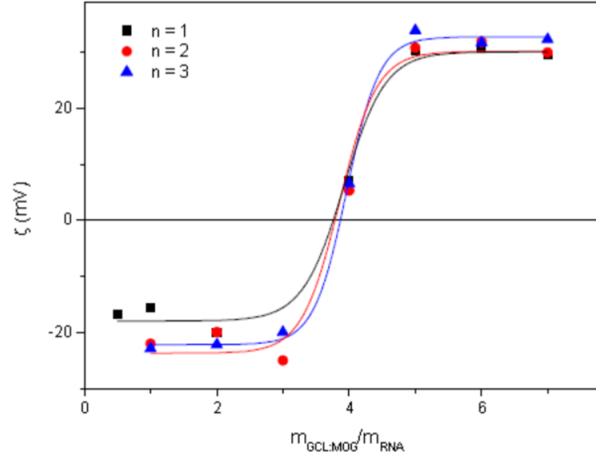
El uso de “small interfering” (siRNAs) ha supuesto un gran avance en la búsqueda de nuevos ácidos nucleicos terapéuticos, a la vez que ha abierto un campo de posibilidades tan novedoso como amplio. Lo primero a tener en cuenta es que para obtener un resultado exitoso, se necesita encontrar los vectores más adecuados para el transporte y liberación del material genético en el interior celular. En la presente Tesis, esta búsqueda se ha basado en los exitosos resultados en la transfección de un plásmido DNA obtenidos con los vectores de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/DOPE$  con  $n = 1, 2$  o  $3$ .<sup>28</sup> De hecho, la eficacia de transfección de estos vectores es notablemente superior a la obtenida con el sistema comercial, Lipofectamina 2000 (L2K). Por ello, en esta Tesis se ha evaluado la eficacia en el silenciamiento del RNA con vectores génicos formados por los lípidos catiónicos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ , descritos previamente en el apartado 4.1.1, pero ahora sustituyendo el lípido zwitteriónico DOPE por el lípido neutro monoleoil glicerol (MOG) que también puede actuar como coadyuvante. El uso de MOG en el lípido mixto aporta dos grandes ventajas; por un lado, al actuar como coadyuvante, mejora la capacidad del lipoplejo para atravesar la membrana celular, y por otro, su uso junto con los siRNA, favorece la formación de las fases cúbicas, las cuales han demostrado ser las más exitosas en el proceso de silenciamiento.<sup>5,34-36</sup> Teniendo en cuenta estas dos premisas, se ha realizado la caracterización fisicoquímica de los lipoplejos de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$ -siRNA, así como la evaluación de su eficacia como vector en el proceso de silenciamiento del RNA.

Como se ha mencionado anteriormente, el valor de la electroneutralidad del lipoplejo es un factor determinante en la preparación de los vectores génicos, por lo que resulta imprescindible determinar previamente su valor. Ello se debe a que, cara a la interacción con la membrana plasmática cargada negativamente, se requieren lipoplejos con carga neta positiva. Puesto que se ha demostrado que, en presencia de DNA, los GCLs poseen una carga efectiva menor que la nominal,<sup>4</sup> inicialmente es necesario determinar su valor real en presencia de RNA.<sup>2,4,12,27,37,38</sup> Sin embargo, se ha demostrado que tanto el DNA lineal como el siRNA presentan una carga efectiva coincidente con su carga nominal ( $-2/bp$ ).<sup>1-3,27,39</sup>

En un estudio previo de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/DOPE$ -ctDNA,<sup>28</sup> se obtuvo un valor de carga efectiva de los lípidos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  un 10% menor que su valor nominal. Por ello, y con el procedimiento previamente descrito,<sup>2</sup> se han determinado las cargas efectivas para la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  con  $n = 1, 2$  o  $3$ , preparando los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$ -siRNA, es decir en presencia del lípido neutro MOG y del ácido nucleico siRNA. El estudio se ha realizado a diferentes relaciones molares  $\alpha = (m_{GCL}/M_{GCL})/(m_{GCL}/M_{GCL} + m_{MOG}/M_{MOG})$  de GCL en el lípido mixto.

En la Figura 5.45 se muestran los valores de  $\zeta$ -potencial frente a la relación de masas vector/RNA ( $m_{GCL/MOG}/m_{RNA}$ ) y a fracción molar  $\alpha = 0,2$ . Se puede observar un perfil sigmoidal con inversión de carga en la electroneutralidad

$(m_{GCL/MOG} / m_{RNA})_{\Phi}$  donde  $\rho_{\text{eff}} = 1$ . La carga obtenida para cada lipoplejo es muy similar, siendo la media  $q_{\text{eff},GCL}^{+} = (+1,8 \pm 0,1)$  lo cual pone de manifiesto que la carga de los 3 GCLs es la misma en los 3 lípidos de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  con  $n = 1, 2$  o  $3$ ).

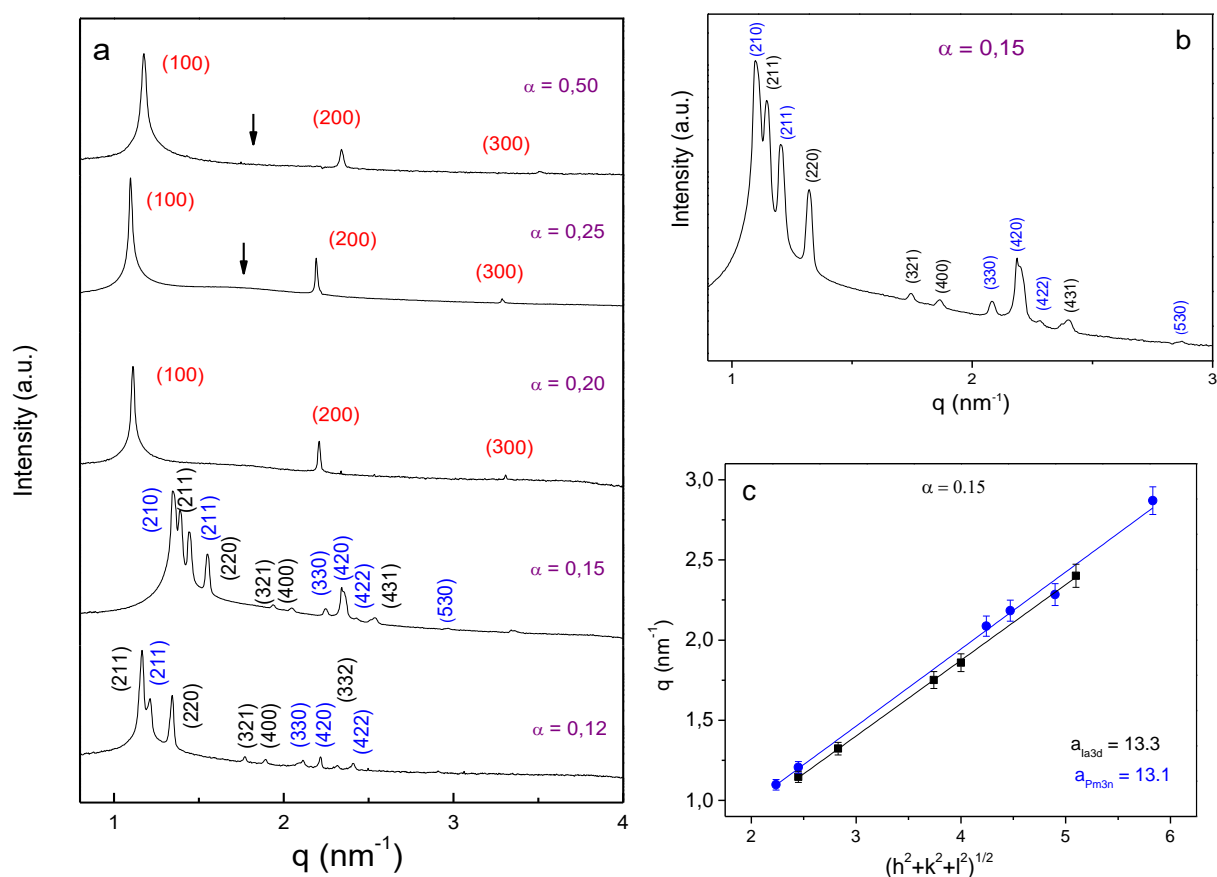


**Figura 5.45.** Valores de potencial  $\zeta$  frente a la relación de masas  $(m_{GCL/MOG} / m_{RNA})$  a fracción molar  $\alpha = 0,2$ , en presencia de un 10% de Pluronic F127, de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  o  $3$ .

Una vez determinada la carga efectiva de GCL en presencia de MOG y siRNA, es posible preparar los lipoplejos a las distintas relaciones de carga efectiva ( $\rho_{\text{eff}}$ ) seleccionadas. Para ello se ha hecho uso de la ecuación 5.3. El valor de  $\rho_{\text{eff}}$  es clave para preparar los lipoplejos en los sucesivos estudios llevados a cabo, tanto biofísicos como bioquímicos.

Mediante experimentos de SAXS se ha analizado la estructura de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  o  $3$ , a varias fracciones molares ( $\alpha$ ) y a varias relaciones de carga efectiva ( $\rho_{\text{eff}}$ ) con y sin Pluronic F127, no habiéndose encontrado diferencias estructurales relacionadas con la presencia o ausencia del polímero Pluronic. En la Figura 5.46a aparece, a modo de ejemplo, uno de los difractogramas donde se representa intensidad frente al factor  $q$ , y en el que también se han incluido los índices de Miller para cada máximo de intensidad de Bragg. La indexación de estos máximos lleva a la elucidación de tres tipos diferentes de fases cristalinas líquidas liotrópicas. A valores bajos de  $\alpha$  (alto contenido en MOG) se observan dos fases cúbicas; una fase cúbica bicontinua doble giroide  $Q_{II}^G$  y una fase cúbica micelar, correspondientes a los grupos espaciales  $Ia3d$  y  $Pm3n$ , respectivamente (ver Figura 5.46a). De acuerdo con el parámetro de red recíproco los máximos se corresponden con los valores  $\sqrt{6}$ ,  $\sqrt{8}$ ,  $\sqrt{14}$ ,  $\sqrt{16}$ ,  $\sqrt{20}$ ,  $\sqrt{22}$ ,  $\sqrt{24}$ ,  $\sqrt{26}$ ,  $\sqrt{30}$  y  $\sqrt{32}$  para la estructura  $Ia3d$ , y con  $\sqrt{5}$ ,  $\sqrt{6}$ ,  $\sqrt{18}$ ,  $\sqrt{20}$ ,  $\sqrt{21}$ ,  $\sqrt{24}$ ,  $\sqrt{34}$ ,  $\sqrt{35}$ ,  $\sqrt{42}$  y  $\sqrt{44}$  para la estructura  $Pm3n$ . A partir de la pendiente de la representación de  $q$  frente a  $(h^2+k^2+l^2)^{1/2}$ , se han obtenido los parámetros de red ( $a$ ) de la celda unidad para las dos fases cúbicas,  $Pm3n$  e  $Ia3d$  (ver Figura 5.46c). La presencia de fases cúbicas está en acuerdo con estudios previos que muestran que el MOG, a bajo contenido en agua, forma fases cúbicas bicontinuas giroides  $Q_{II}^G$ .

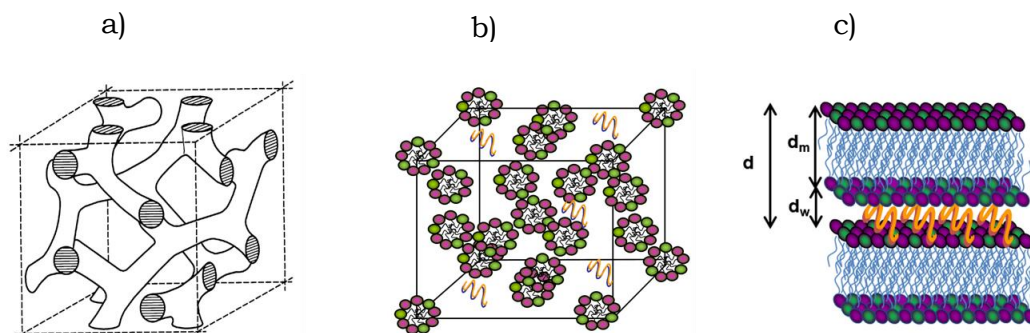
con un grupo espacial Ia3d.<sup>40,41</sup> Los parámetros se han determinado para los tres lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA con y sin Pluronic F127, a las diferentes  $\alpha$  estudiadas y a dos cargas efectivas del lipoplejo ( $\rho_{eff} = 4$  y 8). A modo de ejemplo, en la Figura 5.46c se muestra una de las gráficas (para  $\alpha = 0,15$ ) mientras que el resto de difractogramas se recogen en las Figuras A1-A4 del Anexo 1. Cabe destacar que el parámetro de red (a) no varía con  $\alpha$  ni con  $\rho_{eff}$ , siendo, el valor medio para cada estructura a Ia3d =  $(13,2 \pm 0,7)$  nm y aPm3n =  $(12,9 \pm 0,7)$  nm.



**Figura 5.46.** a) Difractogramas de SAXS de los lipoplejos en presencia de Pluronic F127 a diferentes composiciones de GCL ( $\alpha$ ) y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 4$ . Los índices de Miller están asignados a las estructuras: negro, Ia3d; azul, Pm3n y rojo,  $L_\alpha$ . b) es una imagen ampliada para  $\alpha = 0,15$ . c) Gráfica de factor  $q$  frente a  $(h^2+k^2+l^2)^{1/2}$  para la fase cúbica Ia3d (cuadrados negros) y Pm3n (círculos azules) para  $\alpha = 0,15$ . El valor de  $a$  para cada fase ha sido obtenido de la pendiente ( $= 2\pi / a$ ).

Sin embargo, cuando los valores de  $\alpha$  se encuentran en un rango medio-alto, es decir, a un mayor contenido de GCL, aparece otra estructura, compatible con una fase cristalina liotrópica multilamelar ( $L_\alpha$ ) que se muestra en la Figura 5.47c. Las Tablas A1-A6 del Anexo 1 muestran los valores obtenidos de la periodicidad entre capas ( $d$ ), la cual está directamente relacionada con el factor  $q$ . Al igual que ocurriría con el parámetro  $a$  de las estructuras cúbicas, la periodicidad entre capas ( $d$ ) no muestra dependencia con  $\alpha$  ni con  $\rho_{eff}$  obteniéndose un valor medio  $d_{L\alpha} = (5,6 \pm 0,1)$  nm. Cabe destacar que al igual que para los lipoplejos  $((C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4)$ /DOPE-pDNA previamente

estudiados<sup>28</sup>, a valores medio-altos de  $\alpha$ , SAXS no ofrece evidencias de la existencia de estructuras cúbicas sino solo de lamelares. Esto refuerza la conclusión de que la estructura de los lipoplejos viene determinada por el lípido neutro MOG a bajas fracciones molares ( $\alpha$ ), y por el GCL a valores medio-altos de  $\alpha$ .



**Figura 5.47.** Esquema para las estructuras: a) cúbica bicontinua giroide (Ia3d), b) cúbica micelar (Pm3n), y c) lamelar ( $L_a$ ). El GCL está representado por dos cadenas alquílicas y dos cabezas de grupo (verde); el lípido neutro (MOG) por una cadena alquílica y una cabeza de grupo (morado) y el ácido nucleico (siRNA) por una hélice doble corta (naranja).

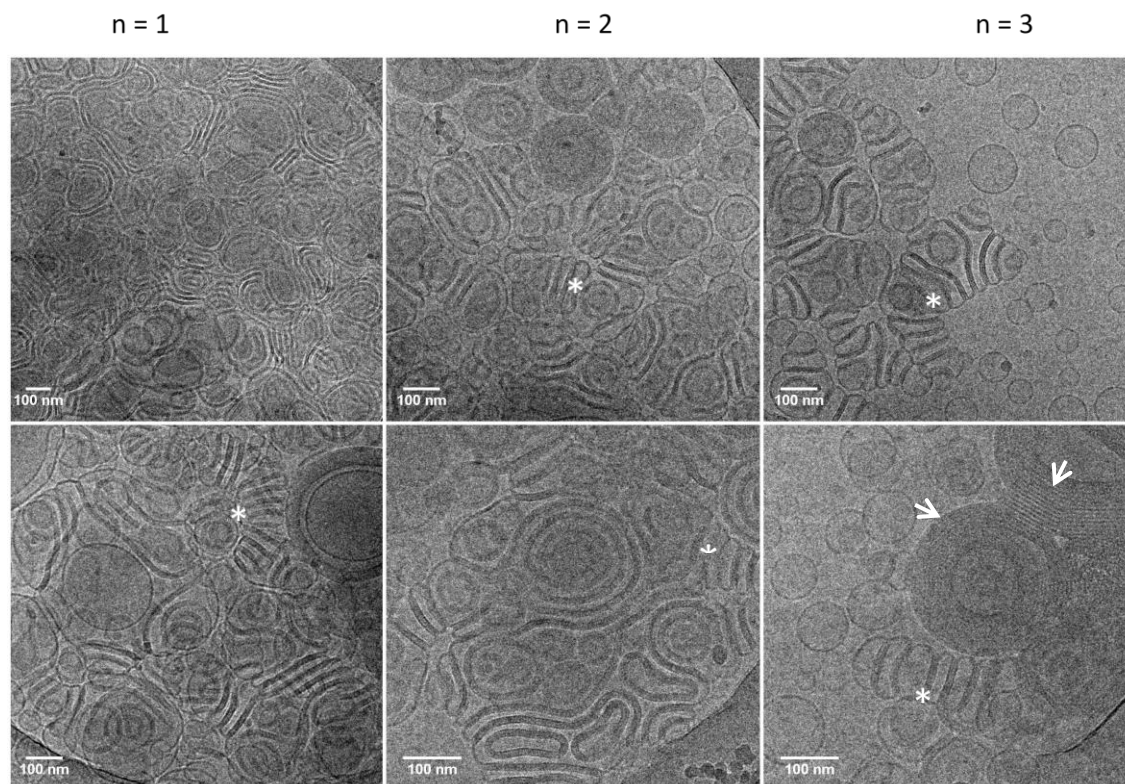
Respecto a la morfología de la fase cúbica Ia3d a nivel molecular, se han publicado diferentes estudios<sup>34,42</sup> que hipotetizan sobre como la fase cúbica bicontinua doble giroide  $Q_{II}^G$  consta de una bicapa, que separa dos nanocanales de agua que serán continuos, independientes y entrelazados con tres puntos de unión a  $120^\circ$  que permiten alojar el siRNA. Sin embargo, otros autores señalan a una fase directa (o inversa), bicontinua micelar de canales en lugar de una morfología de bicapas.<sup>43</sup> En este punto hay que mencionar que, mediante SAXS, no es trivial distinguir entre las tres opciones mencionadas (morfología de bicapas, micelar directa o inversa) para la fase cúbica Ia3d. La estructura Ia3d (Figura 5.47a) ha sido probada como muy eficiente en procesos de silenciamiento cuando el vector estaba compuesto de un lípido monovalente o polivalente y MOG como coadyuvante,<sup>34</sup> atribuyéndose este éxito a la fusión de la membrana, mediada por la presencia de poros en las membranas de la estructura de la celda unidad de la fase cúbica. Esta eficacia de la estructura cúbica, podría estar justificada por alguna fase con nanocanales acuosos catiónicos con siRNA adecuadamente compactado en su interior, es decir, de las tres mencionadas, la morfología en bicapas o la micelar inversa, puesto que la estructura bicontinua micelar directa, con las cadenas hidrofóbicas en el exterior, no resulta muy adecuada. La primera estructura (morfología en bicapas) ofrece adicionalmente una superficie externa catiónica que permitiría cruzar la membrana celular cargada negativamente, pero tiene la dificultad del amoldamiento de la curvatura de la bicapa a las dimensiones de la celda unidad. La segunda estructura (bicontinua micelar inversa), con canales bicontinuos hidrofóbicos, ofrecería una superficie externa catiónica, adecuada para interactuar con la membrana celular, teniendo que ser la compactación del siRNA en la superficie externa de los canales; esta compactación sería menor que la que ofrece una estructura basada en canales acuosos. Entre las tres posibles morfologías para la fase cúbica Ia3d, la más plausible parece ser

una estructura en bicapas, que podría explicar los resultados tanto estructurales como biológicos. Esta asignación también se ve reforzada si tenemos en cuenta el parámetro de empaquetamiento (P) de los componentes; en este caso, el GCL posee un valor de P ligeramente menor que 1, mientras que el del MOG es ligeramente mayor que 1, siendo la fase inversa la menos probable y una estructura basada en bicapas la que reúne más características compatibles.

La otra estructura cúbica encontrada a bajos valores de  $\alpha$  es la Pm3n. Al contrario que la fase Ia3d, que es bicontinua, la fase Pm3n está formada por micelas discretas ordenadas de forma cúbica (Figura 5.47b). Al igual que en el caso anterior, no se puede elucidar mediante SAXS si las micelas se encuentran de manera directa o inversa. No obstante, lo más probable es una estructura con micelas directas, con la carga positiva en la parte externa, y la compactación del siRNA, superficialmente para poder interactuar con la membrana celular, cargada negativamente. La presencia de la estructura micelar se ve reforzada por el hecho de que los lípidos gemini pueden formar micelas en disolución.<sup>44</sup> Cabe destacar que, a pesar de que la fase Pm3n no se encuentra ni para MOG solo, ni para sistemas similares, está documentado que la presencia de otros componentes junto al MOG puede originar la formación de fases distintas a las que se encuentran en el diagrama de fases binario MOG-agua.<sup>45,46</sup> Finalmente la estructura lamelar ( $L_\alpha$ ) se representa por capas alternas de lípidos mixtos y hélices de siRNA, donde  $d = d_m + d_w$ , siendo  $d_m$  y  $d_w$  los espesores de la bicapa lipídica mixta y de la monocapa acuosa del siRNA, respectivamente (Figura 5.47c). Este valor de  $d$ , junto con un valor de  $d_m \approx 3,5$ - $4,0$  nm para la bicapa lipídica GCL/MOG, permite estimar el espesor de la monocapa acuosa ( $d_w \approx 1,6 - 2,1$  nm), suficiente para alojar las hebras de siRNA.

De los estudios de SAXS se pueden obtener varias conclusiones: a bajos contenidos de GCL (bajo  $\alpha$ ), hay coexistencia de fase cúbica bicontinua giroide (Ia3d) y cúbica micelar (Pm3n). Según aumenta la fracción molar de GCL, se produce una transición de fases de las cúbicas (Ia3d y Pm3n) a lamelar ( $L_\alpha$ ). Esto tendría su explicación en que el aumento de la cantidad de GCL implica un decrecimiento de la curvatura negativa del sistema, lo cual ocurre a través del aumento de las repulsiones entre lípidos catiónicos.<sup>47</sup> Además, la estructura cúbica presenta el valor de la periodicidad más alta ( $a \approx 13$  nm), por lo que el orden  $d(L_\alpha) < a(Ia3d) \approx a(Pm3n)$  justificaría que las fases cúbicas sean las más eficaces como vectores.<sup>34</sup>

En combinación con SAXS, crio-TEM es una potente herramienta para obtener información estructural. En esta Tesis se han llevado a cabo experimentos de crio-TEM para lipoplejos de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  o  $3$  a  $\alpha = 0,12$  y  $\rho_{eff} = 4$ . En la Figura 5.48 se muestra una selección de micrografías, que revelan la presencia de nanoagregados micelares alargados referidos en la bibliografía como micelas “wormlike”.<sup>43</sup>



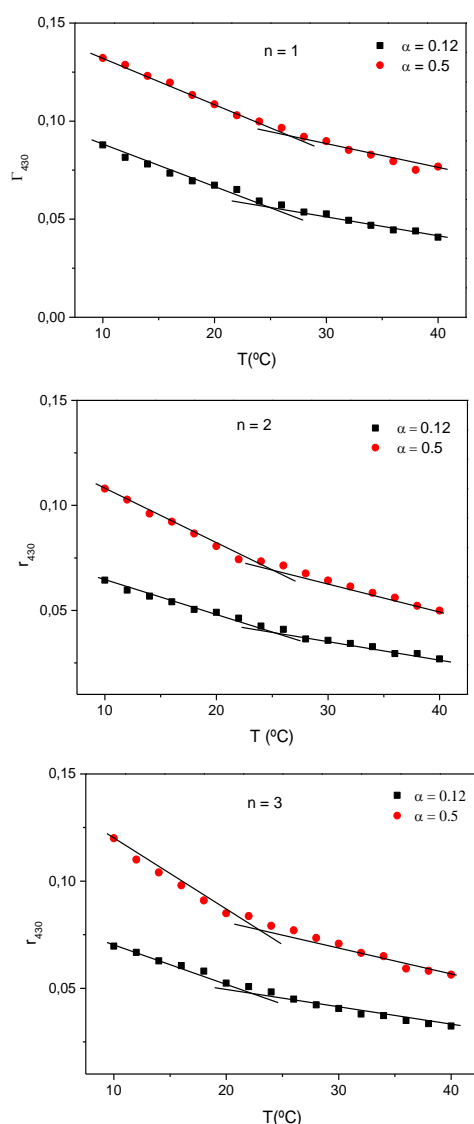
**Figura 5.48.** Micrografías de crio-TEM de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA en presencia de Pluronic F127, a composición  $\alpha = 0,12$  y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 4$  para  $n = 1, 2$  o  $3$ .

Como se ha indicado anteriormente, únicamente mediante crio-TEM no se puede elucidar si se trata de micelas directas o inversas, pero el parámetro de empaquetamiento del MOG, componente mayoritario a  $\alpha = 0,12$ , junto a la buena interacción del vector con las células (tal como se mostrará más adelante) solo puede ser explicado para la condición más favorable que supone que las cabezas catiónicas polares estén en la zona externa. Sin embargo, contrariamente a las muestras sólidas analizadas mediante SAXS, estas micelas “wormlike” no se encuentran dispuestas de manera que constituyan una fase cúbica. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que la concentración usada para estos experimentos de crio-TEM es mucho menor que para SAXS. También hay que señalar que al aumentar la longitud del espaciador ( $n$ ) en el GCL, se observan ciertas contribuciones (pequeñas pero apreciables) de un patrón multilamellar, como “cluster-type” (CT) y “fingerprint” (FP), señalados en la Figura 5.48 con asteriscos y flechas blancas respectivamente. De hecho para el lipoplejo  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA con  $n = 3$  se observan claramente regiones de nanoagregados tipo FP. Este patrón, que ya fue encontrado en la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /DOPE-pDNA,<sup>4,28</sup> es consistente con la fase  $L_\alpha$  observada en SAXS.

La fluidez de la bicapa lipídica también es un factor importante a la hora de evaluar la eficacia de un vector. Entre otras propiedades, la fluorescencia de anisotropía ( $r$ ) sirve como una medida de la fluidez de la membrana. En este trabajo se ha medido la fluorescencia de anisotropía para los lipoplejos



$(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  o  $3$ , usando para ello la sonda fluorescente DPH. La Figura 5.49 muestra la fluorescencia de anisotropía ( $r$ ) frente a la temperatura para los tres lipoplejos y a dos diferentes fracciones molares ( $\alpha = 0,12$  y  $0,5$ ). A través de estudios previos en la bibliografía, en los que se han observado dos tipos de perfiles, se sabe que el tipo de lípido coadyuvante es el que controla este perfil, de manera que si pertenece a la familia de las fosfatidilcolinas se origina un perfil sigmoidal, mientras que si pertenece a la familia de las fosfatidiletanolaminas (como DOPE o colesterol) se observa un decrecimiento monótono.<sup>25,26</sup>



**Figura 5.49.** Anisotropía de fluorescencia a 430 nm ( $r_{430}$ ) de DPH frente a la temperatura para los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA en presencia de Pluronic F127, a composición  $\alpha = 0,12$  y  $0,5$  y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 8$  para  $n = 1, 2$  o  $3$ .

De la Figura 5.49 se concluye que el MOG muestra un comportamiento similar al de los lípidos coadyuvantes de la familia de las fosfatidiletanolaminas, ya que los perfiles de la anisotropía de fluorescencia muestran un decrecimiento monótono. Otro dato interesante que se observa en la Figura 5.49 es que, independientemente del valor de  $n$  y de  $\alpha$ , los valores de anisotropía son



realmente bajos ( $0,03 < r < 0,13$ ), lo cual es indicativo de la gran fluidez que presentan las bicapas de estos nanoagregados. El hecho de que, además, estos valores de anisotropía sean menores que los que presentaban los mismos lípidos catiónicos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  con DOPE y pDNA,<sup>28</sup> en los lipoplejos de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/DOPE$ -pDNA, indican que: i) la fluidez de las bicapas es más alta cuando interaccionan con pequeños fragmentos de ácido nucleico, como el caso del siRNA (20 bp) comparado con el pDNA (4700 bp), y ii) que la presencia de MOG en el lipoplejo produce mayor decrecimiento de la anisotropía que el DOPE. Este efecto es incluso más acusado con el incremento del contenido en MOG, es decir, con el decrecimiento de la fracción molar  $\alpha$ . Así, los valores para  $\alpha = 0,12$  son menores que para  $\alpha = 0,5$  a todas las temperaturas y para todas las longitudes de espaciador. Por ello, se puede decir que el MOG es un lípido coadyuvante y fusogénico, potencialmente eficaz tanto en transfección como en silenciamiento. En la Figura 5.49 también se observa que la fluidez de la bicapa aumenta con la temperatura, lo que permite estimar los valores de la temperatura de transición ( $T_m$ ) para cada una de las condiciones de estudio. Estos valores, reflejados en la Tabla 5.14, conducen a un valor medio  $T_m = (24 \pm 2) ^\circ C$ , lo que indica que las bicapas lipídicas de estos lipoplejos se encuentran en estado fluido a temperatura fisiológica ( $37 ^\circ C$ ) y, por tanto, los procesos de transfección *in vivo* estarán altamente favorecidos. Considerando la influencia de la  $T_m$  en la fluidez y estabilidad de la membrana de los lipoplejos, la elección del lípido catiónico y/o coadyuvante es clave para una transfección óptima del ácido nucleico. En este caso, el doble enlace *cis* en la posición 9-10 de la cadena hidrofóbica del MOG, similar a las que tiene el DOPE en sus dos cadenas, confiere al MOG un carácter fusogénico similar o incluso mejor que el DOPE.

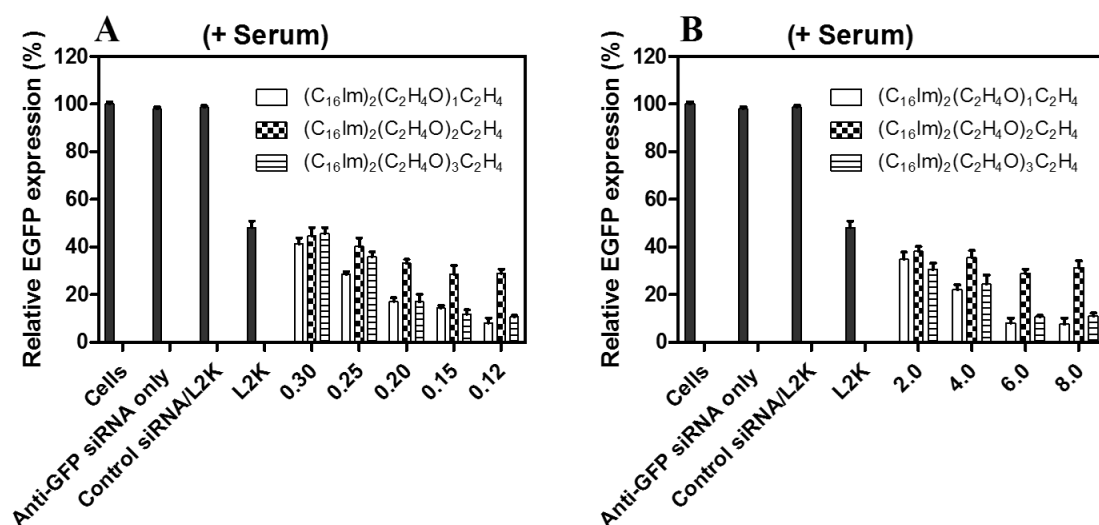
**Tabla 5.14.** Valores de  $T_m$  para los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$ -siRNA en presencia de Pluronic F127, a composición  $\alpha = 0,12$  y  $0,5$  y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 8$  para  $n = 1, 2$  o  $3$ .

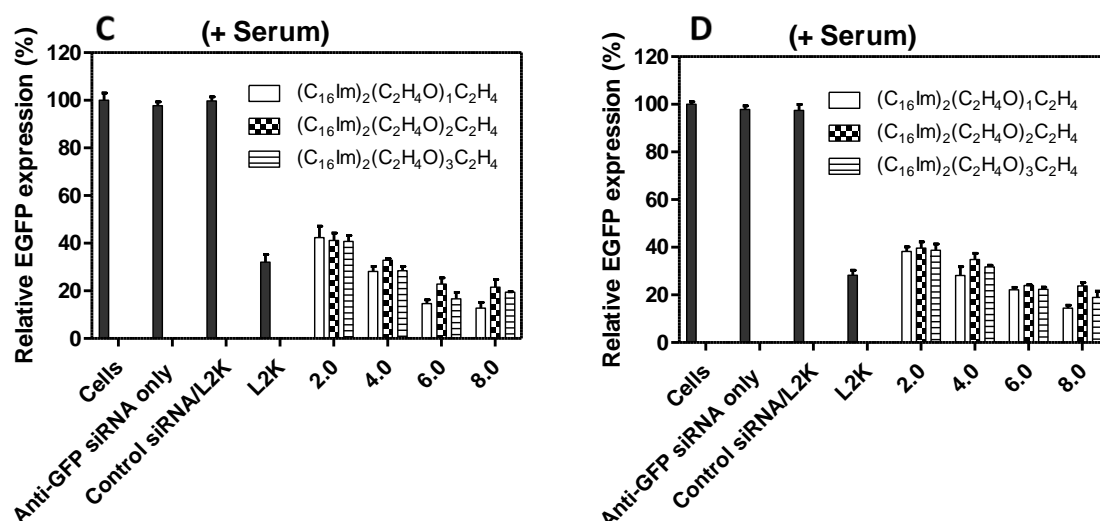
n	$\alpha$	$T_m$ ( $^\circ C$ )
1	0,12	26
	0,50	25
2	0,12	25
	0,50	24
3	0,12	25
	0,50	21

Por último, con el objetivo de analizar la eficacia de silenciamiento de estos sistemas, se han realizado experimentos en ausencia y en presencia de suero (10% FBS). El silenciamiento se ha analizado en términos de la disminución de la expresión relativa de EGFP en la línea celular HEK 293T mediante un siRNA antiGFP.<sup>48,49</sup> Los experimentos se han hecho a diferentes fracciones molares de GCL y MOG ( $\alpha = 0,30; 0,25; 0,20; 0,15$  y  $0,12$ ) y a diferentes relaciones de carga efectiva del lipoplejo ( $\rho_{eff} = 2, 4, 6$  y  $8$ ). Se han utilizado varios controles; como control negativo se ha usado siRNA-antiGFP y L2K con un siRNA (no dirigido a siRNA), y como control positivo se ha usado L2K. Al principio, todos los experimentos anti-GFP con siRNA se realizaron con y sin Pluronic F127, obteniéndose mejores eficiencias en presencia de Pluronic F127 (Figura A5 del

Anexo 1). Por ello, los experimentos siguientes se realizaron únicamente en presencia de Pluronic F127. Estos últimos resultados (Figura 5.50) indican que los tres lipoplejos a la fracción molar  $\alpha = 0,12$  y  $0,15$  para carga efectiva  $\rho_{\text{eff}} = 6$  y  $8$  presentan un silenciamiento superior al 80%. Como se puede observar, hay varios aspectos a destacar. Por un lado, el silenciamiento es significativamente mayor en los sistemas analizados en esta Tesis que contienen un GCL de la serie  $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4$  con  $n = 1, 2$  o  $3$  que para el reactivo comercial (L2K). Por otro lado, apenas se observa silenciamiento en el caso del control siRNA negativo, con una expresión relativa de EGFP comparable a la de las células sin tratar.

Se sabe que el suero suele ser un impedimento a la hora de la liberación de los ácidos nucleicos en el medio celular. En este caso, en presencia de suero, todas las formulaciones GCL/MOG han mantenido su actividad de silenciamiento (entorno a un 80% para  $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4$  con  $n = 1$  y  $3$ ; y más del 70% para  $(C_{16}\text{Im})_2(C_2\text{H}_4\text{O})_2\text{C}_2\text{H}_4$ , mientras que se observa una disminución para L2K (entorno al 50%). También se han realizado experimentos de silenciamiento utilizando otras dos líneas celulares: HeLa (carcinoma cervical) y H1299 (cáncer humano de pulmón). Los resultados han sido similares a los obtenidos con las células HEK 293T encontrándose el máximo silenciamiento ( $>80\%$ ) para una fracción molar  $\alpha = 0,12$  y una relación de carga efectiva 6 y 8. (Figura 5.49C y D).

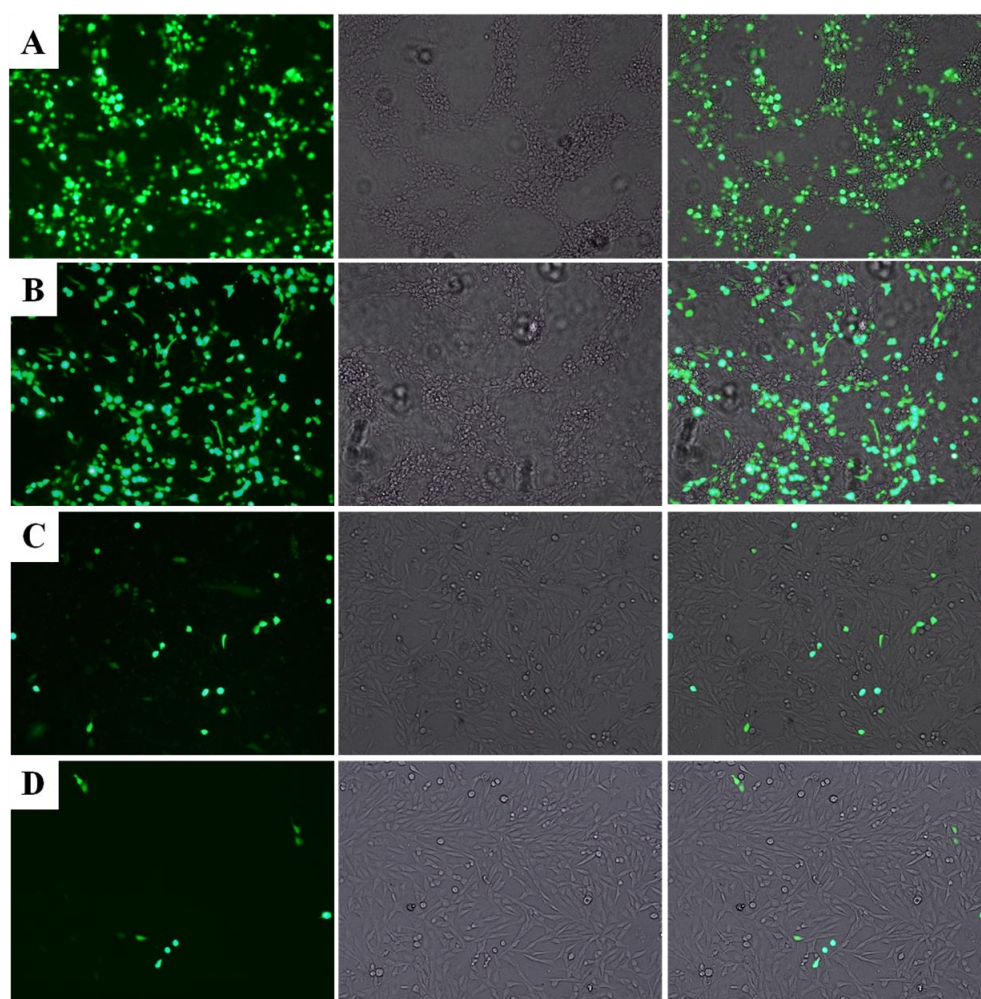




**Figura 5.50.** Análisis de citometría de flujo del silenciamiento de EGFP en transfecciones de siRNA anti-GFP (50 nM) de EGFP expresado en células HEK 293T en presencia de suero (10% FBS) mediado por los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_nC_2H_4$  /MOG-siRNA para (A) composición  $\alpha = 0,30$ ; 0,25; 0,20; 0,15 y 0,12 y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 6$ , y (B) varias relaciones de carga efectiva  $\rho_{eff} = 2, 4, 6$  y 8 para una fracción molar  $\alpha = 0,12$ . Análisis del silenciamiento de EGFP expresado en células HeLa (C), y H1299 (D), a  $\rho_{eff} = 2, 4, 6$  y 8 para una fracción molar  $\alpha = 0,12$ .

Esto significa que, en presencia de suero, los lipoplejos con siRNA basados en liposomas GCL del tipo  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_nC_2H_4$  con  $n = 1, 2$  o 3 pueden transfectar DNA o silenciar RNA líneas celulares de distinto origen. Tales resultados implican un gran avance puesto que incluso con el reactivo comercial L2K, la eficacia del silenciamiento disminuye considerablemente.<sup>50</sup>

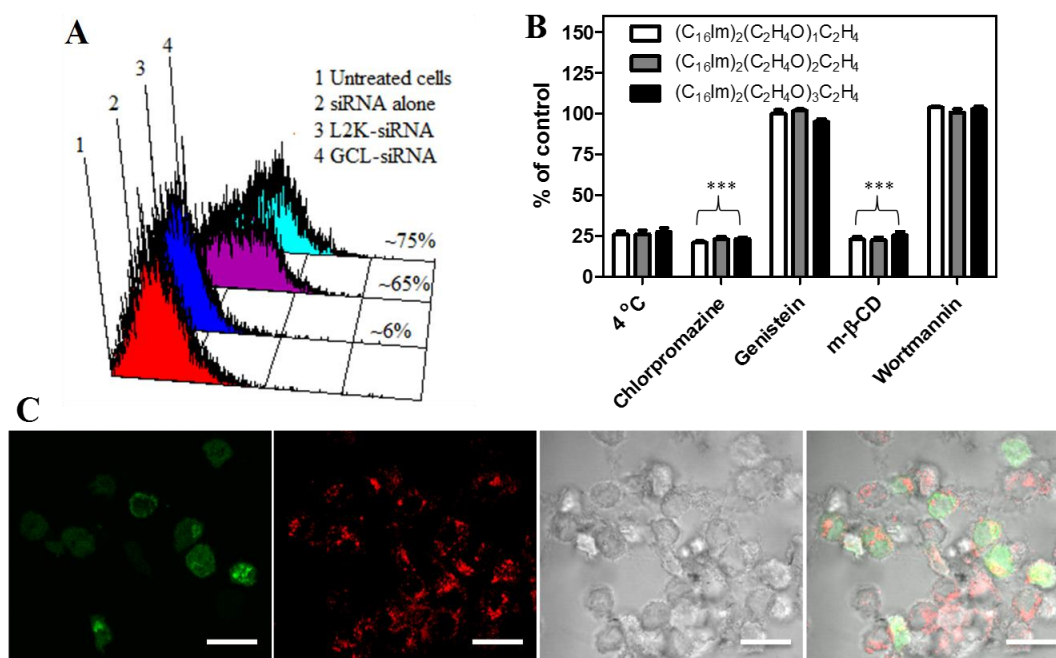
El análisis visual de la actividad de silenciamiento del EGFP se ha realizado con microscopia de fluorescencia. El siRNA anti-GFP con lipoplejos a la fracción molar óptima ( $\alpha = 0,12$ ) muestra un silenciamiento notable para la expresión de EGFP, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en citometría de flujo. Además, el silenciamiento en presencia de L2K es mucho menor que para la formulación óptima de los GCLs estudiados. En la Figura 5.51 se muestran las imágenes más representativas de microscopia de fluorescencia de EGFP expresado en la línea celular HeLa y del resultado tras la transfección de siRNA anti-GFP con liposomas  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_nC_2H_4$  en comparación con la L2K. En la Figura A6 del Anexo 1 se muestran las imágenes de la expresión de EGFP en la línea celular HEK 293T.



**Figura 5.51.** Imágenes representativas de microscopia de fluorescencia para la expresión de EGFP en las línea celulares HeLa (A) y para los transfectados con siRNA anti GFP en presencia de suero (10% FBS) con los coliposomas de  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  con MOG para  $\alpha = 0,12$  y relación de carga efectiva  $\rho_{eff} = 8$  (D). Las células transfectadas únicamente con siRNA anti GFP (B) y los lipoplejos de siRNA L2K-anti-GFP (C) sirvieron como control en el experimento. Cada panel de izquierda a derecha representa la fluorescencia de EGFP, imágenes de campo claro y composición de las dos anteriores.

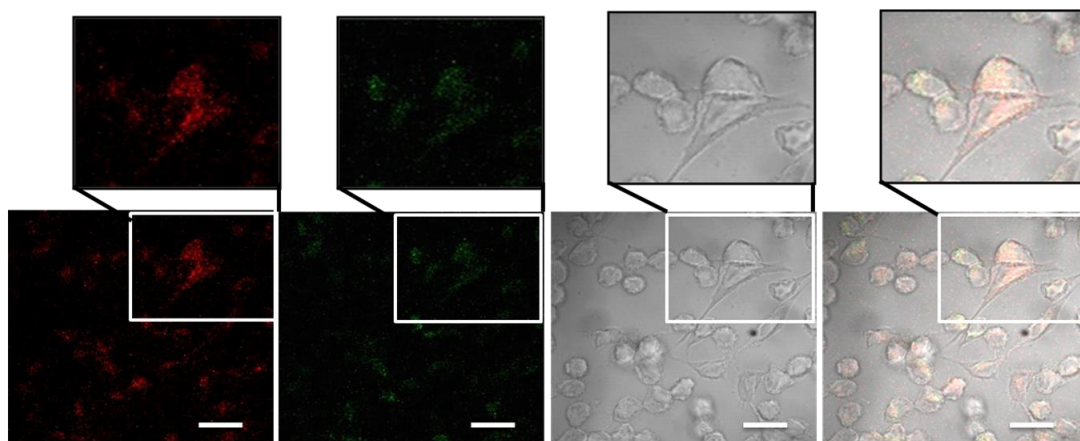
El siguiente paso ha sido examinar la captación e internalización celular de los lipoplejos, y para ello, en la preparación de lipoplejos se ha añadido siRNA marcado con Cy-3. La internalización de los lipoplejos marcados, a  $\alpha = 0,12$ , y a  $\rho_{eff} = 8$ , a las 4 h de incubación, se ha analizado por citometría de flujo. Como puede verse en la Figura 5.52A, hay una cantidad notable de siRNA intracelular. Se ha utilizado el tratamiento con L2K como control positivo. La internalización celular de las moléculas de siRNA marcadas para la expresión de EGFP también ha sido corroborada mediante microscopia confocal (Figura 5.52C). En cuanto a la citometría de flujo, los experimentos se han realizado a baja temperatura (4 °C), donde la captación de los tres lipoplejos se reduce al 75%, e indica que es un proceso dependiente de la energía (Figura 5.52B). Por un lado, el pretratamiento de células con inhibidores de clorpromazina (endocitosis mediada por clatrina) y metil- $\beta$ -ciclodextrina (reducción de colesterol de la membrana plasmática), bloquea notablemente la captación de los lipoplejos (80%). Por otro lado, el pretratamiento celular con genisteína

(captación caveolar) y wortmanina (captación macropinocitótica) no han afectado a la captación celular de los lipoplejos (Figura 5.52B). Este hecho sugiere que esta familia de lipoplejos utiliza la vía de endocitosis mediada por clatrina, la cual engloba los endosomas/lisosomas para la entrada celular.<sup>51,52</sup>



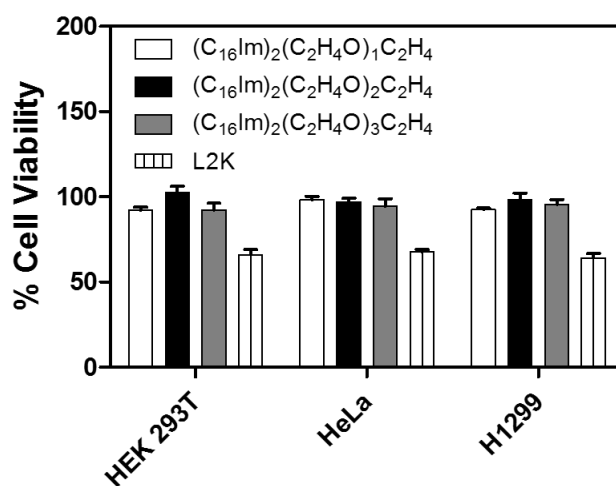
**Figura 5.52.** A) Representación tridimensional de histogramas de citometría de flujo que representa la fluorescencia intracelular del siRNA marcado con Cy-3 para transfecciones mediadas por el coliposoma (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> /MOG para  $\alpha = 0,12$  y  $\rho_{eff} = 8$  en comparación con L2K y tratamientos solo con siRNA. B) Captación celular de lipoplejos de diferentes liposomas GCL a baja temperatura (4° C) y en presencia de varios inhibidores de endocitosis. La actividad de transfección ha sido analizada por comparación con controles sin tratar mediante análisis estadístico. C) La internalización celular del siRNA células HeLa expresando EGFP con (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> durante 4 h. Las imágenes de izquierda a derecha representan la fluorescencia de EGFP, la fluorescencia del siRNA Cy-3, imágenes de campo y la composición de las tres imágenes previas con una escala barra = 20 μm.

Para dar un paso más en la confirmación del silenciamiento, se han llevado a cabo experimentos de microscopia confocal, donde el Lyso-Tracker-Green (50nM) se ha usado para teñir los endosomas/lisosomas después del tratamiento con los lipoplejos durante 2 h. La fluorescencia del siRNA se localiza en la misma zona que la fluorescencia de LysoTracker, lo cual sugiere una entrada celular de los lipoplejos por endocitosis (Figura 5.53).<sup>52,53</sup>



**Figura 5.53.** Análisis de microscopía confocal para el movimiento intracelular de los lipoplejos (coliposomas de MOG y  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  /Cy-3 siRNA a  $\alpha = 0,12$  y  $\rho_{eff} = 8$ ) después de la incubación con células HeLa durante 2 h. Los endosomas/lisosomas se han teñido con LysoTracker verde (50nm). Las micrografías de izquierda a derecha representan la fluorescencia del siRNA, la fluorescencia de LysoTracker, imágenes de campo y composición de las imágenes anteriores con una escala barra = 20  $\mu m$ .

Las formulaciones adecuadas de liposomas para terapia génica deben tener mínima respuesta citotóxica para aplicaciones *in vivo*.<sup>54</sup> Para evaluar la viabilidad celular de los lipoplejos se ha llevado a cabo un ensayo MTT después de 48 h de haber incubado las células con los complejos que contenían el siRNA durante 4 h. En la Figura 5.54 se puede observar que no hay una respuesta citotóxica en ninguna de las líneas celulares. Ello significa que estos lipoplejos son altamente biocompatibles y pueden usarse para aplicaciones *in vitro* y potencialmente *in vivo*.



**Figura 5.54.** Viabilidad celular de la líneas celulares HEK 293T, HeLa y H1299 después de la transfección en presencia de suero (10% FBS) con lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  /MOG-siRNA, con  $n = 1, 2$  o  $3$  a  $\alpha = 0,12$  y  $\rho_{eff} = 8$ . Los tratamientos mediados por L2K-siRNA sirven como control positivo en los experimentos.



### *Relación estructura-actividad*

La estructura de los lipoplejos formados por el vector génico y el grado y tipo de compactación del ácido nucleico depende significativamente de las características moleculares de sus componentes, afectando también a la eficacia del silenciamiento a la hora de liberar el ácido nucleico.<sup>2,28,55</sup> SAXS y Crio-TEM aportan una gran cantidad de información que permite establecer la estructura de los lipoplejos, así: i) cuando el lípido coadyuvante pertenece a la familia de las fosfatidilcolinas (tipo DOPC)<sup>56</sup> se suelen formar estructuras lamelares ( $L_\alpha$ ) en todo el rango de fracciones molares de lípido mixto, ii) cuando el coadyuvante pertenece a la familia de la fosfatidiletanolaminas (tipo DOPE) predomina la estructura hexagonal invertida ( $H_{II}$ ) a bajas fracciones molares ( $\alpha$ ) y lamelar ( $L_\alpha$ ) a valores de  $\alpha$  moderados y altos.<sup>1,3,57,58</sup> Sin embargo, en los estudios de silenciamiento de esta Tesis, en los cuales los lipoplejos están constituidos por una combinación de un siRNA corto (20-24bp) y un lípido neutro, como el MOG, además de la estructura lamelar (dependiente del GCL, y por tanto aparece a  $\alpha$  medio y altos) se ha encontrado la estructura cúbica giroide invertida<sup>59</sup> a bajos valores de  $\alpha$  (alto contenido en MOG). En general, está aceptado por la comunidad internacional que la fase hexagonal invertida (para transfección) y cúbica (para silenciamiento) son estructuras más eficientes que las lamelares. La alta eficacia de silenciamiento mostrada por la fase cúbica puede deberse a su propensión a la fusión con la membrana endosomal a altos contenidos de MOG.<sup>34,59</sup> Así, el confinamiento de los complejos CL/MOG-siRNA con pequeños compartimentos endosomales incrementa la capacidad de la membrana lipídica para formar los poros necesarios para la fusión. La preferencia del MOG por fases cúbicas bicontinuas aumenta la capacidad de la membrana para formar poros, mientras que el CL incrementa la atracción electrostática por la membrana endosomal cargada negativamente. Como resultado de ambos procesos hay una promoción de la fusión entre las membranas de los lipoplejos CL/MOG-siRNA y la membrana endosomal, lo cual conduce a una liberación eficaz del siRNA en el citoplasma.

Todas estas consideraciones han sido confirmadas en los lipoplejos de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG-siRNA$  con  $n = 1, 2$  y  $3$ , estudiados en esta Tesis. De todos ellos, la mayor eficacia de silenciamiento se ha encontrado a muy bajas fracciones molares de  $\alpha$  (0,12-0,15), donde, mediante SAXS, se ha determinado una estructura cúbica bicontinua doble giroide invertida  $Ia3d$  (en la mayoría de los lipoplejos en coexistencia con la otra fase cúbica  $Pm3n$ ), mientras que a valores más altos de  $\alpha$  ( $> 0,2$ ) la eficacia de silenciamiento disminuye considerablemente. Sin embargo, para todos los lipoplejos estudiados, la formulación óptima tiene una actividad como agente silenciador mucho mayor que el control positivo L2K.

### 5.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Muñoz-Ubeda, M.; Misra, S. K.; Barran-Berdon, A. L.; Datta, S.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3926.
- (2) Misra, S. K.; Muñoz-Ubeda, M.; Datta, S.; Barran-Berdon, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3951.
- (3) Muñoz-Ubeda, M.; Misra, S. K.; Barran-Berdon, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014.
- (4) Barran-Berdon, A. L.; Misra, S. K.; Datta, S.; Muñoz-Ubeda, M.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4640.
- (5) Junquera, E.; Aicart, E. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *233*, 161.
- (6) Gabizon, A.; Papahadjopoulos, D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1992**, *1103*, 94.
- (7) Liu, D.; Mori, A.; Huang, L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1992**, *1104*, 95.
- (8) Junquera, E.; Aicart, E. *Curr. Topics Med. Chem.* **2014**, *14*, 649.
- (9) Oda, R.; Huc, I.; Schmutz, M.; Candau, S. J.; MacKintosh, F. C. *Nature* **1999**, *399*, 566.
- (10) Oda, R.; Huc, I.; Homo, J. C.; Heinrich, B.; Schmutz, M.; Candau, S. *Langmuir* **1999**, *15*, 2384.
- (11) Ziserman, L.; Lee, H. Y.; Raghavan, S. R.; Mor, A.; Danino, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2511.
- (12) Barran-Berdon, A. L.; Muñoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Perez, L.; Infante, M. R.; Castro-Hartmann, P.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7368.
- (13) Vulugundam, G.; Kumar, K.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4310.
- (14) Biswas, J.; Mishra, S. K.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4600.
- (15) Heldman, E.; Linder, C.; Grinberg, S.; Popov, M.; Hollander, I. *Neurology* **2014**, *82*, S10. 003.
- (16) Philosof-Mazor, L.; Dakwar, G. R.; Popov, M.; Kolusheva, S.; Shames, A.; Linder, C.; Greenberg, S.; Heldman, E.; Stepensky, D.; Jelinek, R. *Int. J. Pharm.* **2013**, *450*, 241.
- (17) Popov, M.; Hammad, I. A.; Bachar, T.; Grinberg, S.; Linder, C.; Stepensky, D.; Heldman, E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *85*, 381.
- (18) Hwang, S. R.; Kim, K. *Archives of pharmacal research* **2014**, *37*, 24.
- (19) Stern, A.; Guidotti, M.; Shaubi, E.; Popov, M.; Linder, C.; Heldman, E.; Grinberg, S. *International journal of nanomedicine* **2014**, *9*, 561.
- (20) Jain, N.; Arntz, Y.; Goldschmidt, V.; Duportail, G.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. *Bioconjugate. Chem.* **2010**, *21*, 2110.
- (21) Jain, N.; Goldschmidt, V.; Oncul, S.; Arntz, Y.; Duportail, G.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423*, 392.
- (22) Kim, T.; Afonin, K. A.; Viard, M.; Koyfman, A. Y.; Sparks, S.; Heldman, E.; Grinberg, S.; Linder, C.; Blumenthal, R. P.; Shapiro, B. A. *Molecular Therapy—Nucleic Acids* **2013**, *2*, e80.
- (23) Weissig, V.; Torchilin, V. P. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *49*, 127.



- (24) Barran-Berdon, A. L.; Yelamos, B.; Garcia-Rio, L.; Domenech, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 14404.
- (25) Bhattacharya, S.; Haldar, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1283, 21.
- (26) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 15648.
- (27) Badwaik, V. D.; Aicart, E.; Mondjinou, Y. A.; Johnson, M. A.; Bowman, V. D.; Thompson, D. H. *Biomaterials* **2016**, 84, 86.
- (28) Kumar, K.; Barran-Berdon, A. L.; Datta, S.; Munoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 1495.
- (29) Palchetti, S.; Pozzi, D.; Marchini, C.; Amici, A.; Andreani, C.; Bartolacci, C.; Digiacomo, L.; Gambini, V.; Cardarelli, F.; Di Rienzo, C.; Peruzzi, G.; Amenitsch, H.; Palermo, R.; Screpanti, I.; Caracciolo, G. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, in press.
- (30) Maiolo, D.; Del Pino, P.; Metrangolo, P.; Parak, W. J.; Bombelli, F. B. *Nanomedicine* **2015**, 10, 3231.
- (31) Diaz-Moscoso, A.; Vercauteren, D.; Rejman, J.; Benito, J. M.; Ortiz Mellet, C.; De Smedt, S. C.; García Fernandez, J. M. *J. Controlled Release* **2010**, 143, 318.
- (32) Aranda, C.; Urbiola, K.; Ardoy, A. M.; García Fernandez, J. M.; Ortiz Mellet, C.; Tros de Ilarduya, C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 85, 390.
- (33) Mendez-Ardoy, A.; Urbiola, K.; Aranda, C.; Ortiz Mellet, C.; Garcia Fernandez, J. M.; Tros de Ilarduya, C. *Nanomedicine* **2011**, 6, 1697.
- (34) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16841.
- (35) Oliveira, A. C. N.; Raemdonck, K.; Martens, T.; Rombouts, K.; Simon-Vazquez, R.; Botelho, C.; Lopes, I.; Lucio, M.; Gonzalez-Fernandez, A.; Oliveira, M.; Gomes, A. C.; Braeckmans, K. *Acta Biomater.* **2015**, 25, 216.
- (36) Oliveira, A. C. N.; Martens, T. F.; Raemdonck, K.; Adati, R. D.; Feitosa, E.; Botelho, C.; Gomes, A. C.; Braeckmans, K.; Oliveira, M. E. C. D. R. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 6977.
- (37) Ahmad, A.; Evans, H. M.; Ewert, K.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *J. Gene Med.* **2005**, 7, 739.
- (38) Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 877.
- (39) Muñoz-Ubeda, M.; Rodriguez-Pulido, A.; Nogales, A.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3332.
- (40) Larsson, K. *Nature* **1983**, 304, 664.
- (41) Briggs, J.; Chung, H.; Caffrey, M. *J. Phys. II* **1996**, 6, 723.
- (42) Kulkarni, C. V.; Wachter, W.; Iglesias-Salto, G.; Engelskirchen, S.; Ahualli, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 3004.
- (43) Li, S. D.; Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, 1788, 2259.
- (44) Zana, R.; Xia, J. *Gemini Surfactants*; Marcel Dekker, Inc: New York, 2004; Vol. 117.
- (45) Guillot, S.; Salentinig, S.; Chemelli, A.; Sagalowicz, L.; Leser, M. E.; Glatter, O. *Langmuir* **2010**, 26, 6222.
- (46) Yaghmur, A.; de Campo, L.; Salentinig, S.; Sagalowicz, L.; Leser, M. E.; Glatter, O. *Langmuir* **2006**, 22, 517.
- (47) Liu, Q. T.; Dong, Y. D.; Hanley, T. L.; Boyd, B. J. *Langmuir* **2013**, 29, 14265.
- (48) Kumar, K.; Maiti, B.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, 12, 351.
- (49) Malamas, A. S.; Gujrati, M.; Kummitha, C. M.; Xu, R. Z.; Lu, Z. R. *J. Controlled Release* **2013**, 171, 296.

- (50) Chan, C. L.; Ewert, K. K.; Majzoub, R. N.; Hwu, Y. K.; Liang, K. S.; Leal, C.; Safinya, C. R. *J. Gene Med.* **2014**, 16, 84.
- (51) Huth, U. S.; Schubert, R.; Peschka-Suss, R. *J. Controlled Release* **2006**, 110, 490.
- (52) Li, Y.; Liu, R. Y.; Shi, Y. J.; Zhang, Z. Z.; Zhang, X. *Theranostics* **2015**, 5, 583.
- (53) Liu, H. M.; Li, Y.; Mozhi, A.; Zhang, L.; Liu, Y. L.; Xu, X.; Xing, J. M.; Liang, X. J.; Ma, G. H.; Yang, J.; Zhang, X. *Biomaterials* **2014**, 35, 6519.
- (54) Tseng, Y. C.; Mozumdar, S.; Huang, L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 721.
- (55) Foldvari, M.; Badea, I.; Wettig, S.; Verrall, R.; Bagonluri, M. *J. Exp. Nanosci.* **2006**, 1, 165.
- (56) Shirazi, R. S.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Majzoub, R. N.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1808, 2156.
- (57) Koynova, R.; Tarahovsky, Y. S.; Wang, L.; MacDonald, R. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1768, 375.
- (58) Dohmen, C.; Edinger, D.; Fröhlich, T.; Schreiner, L.; Lächelt, U.; Troiber, C.; Rädler, J.; Hadwiger, P.; Vornlocher, H. P.; Wagner, E. *ACS Nano* **2012**, 6, 5198.
- (59) Leal, C.; Ewert, K. K.; Bouxsein, N. F.; Shirazi, R. S.; Li, Y. L.; Safinya, C. R. *Soft Matter* **2013**, 9, 795.



# CAPÍTULO 6

ASPECTOS MÁS  
RELEVANTES

## 6.- ASPECTOS MAS RELEVANTES

---

La caracterización biofísica junto con la evaluación de la actividad biológica y viabilidad celular de los complejos, formados por un vector catiónico (no viral) de distinta naturaleza y un plásmido de DNA, llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, así como el análisis detallado de la composición de la corona de proteínas formada sobre la superficie de algunos de estos complejos cuando se incubaron con suero humano, me permiten ahora tener una perspectiva global del proceso de transfección celular de plásmidos y de los factores más determinantes en sus niveles de eficacia y seguridad, que paso ahora a resumir.

El primer objetivo de esta Tesis Doctoral se enmarca, como ya se ha comentado con anterioridad, en la línea de investigación principal del grupo de investigación al que pertenezco: la búsqueda constante de vectores no virales de DNA que mejoren las prestaciones bioquímicas de los ya existentes y del estándar Lipofectamina 2000. Es decir, se trataba, y se trata, de ir probando constantemente nuevas moléculas con la idea de encontrar vectores que presenten mejores niveles de transfección y menores citotoxicidades que los anteriores, incluidos los utilizados como controles o estándares. Con este reto en mente, en esta Tesis se han probado distintas estrategias, partiendo de la información aportada por tesis anteriores del grupo, y trabajando en todos los casos sobre la base de vectores de naturaleza lipídica, bien porque sean lípidos (la mayoría de los utilizados), o porque incluyan en su estructura una matriz lipídica, como es el caso de las paCDs. Sabíamos que los GCLs parecían dar mejores resultados que los lípidos monovalentes, siendo la longitud, flexibilidad y tipo de espaciador, y la longitud de las cadenas hidrofóbicas, factores importantes a considerar. De hecho, los resultados obtenidos en tesis anteriores del grupo indicaban que las cadenas largas (de C<sub>16</sub> en adelante), y los espaciadores cortos y con grupos hidrofílicos conducían a vectores con buenas prestaciones bioquímicas. Además, que las cargas positivas de las cabezas catiónicas del GCL estuvieran deslocalizadas parecía ser un factor potenciador de la eficacia transfectora del vector. De hecho, el lípido gemini (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> de la serie dihexadecil diimidazol polioxiétileno (con n = 1, 2, o 3), con cadenas de 16 átomos de C, un espaciador con grupos oxietileno y cabezas imidazol (carga deslocalizada) resultó ser un vector mucho más eficaz y seguro que el propio control universal (Lipofectamina 2000). Con toda esta información como punto de partida, en esta Tesis se han probado dos familias de vectores catiónicos: vectores lipídicos y vectores macrocíclicos con matriz lipídica. Dentro del primer grupo, se ha centrado la atención esencialmente en lípidos catiónicos gemini (GCLs) de distinto tipo: i) tipo GCL, con cabezas convencionales (tipo amonio cuaternario) y espaciadores aromáticos (12PH12), poco ensayados en la literatura; ii) tipo GCL, pero incorporando restos de His (caracterizados por poseer grupos imidazol) en las cabezas y espaciadores con grupos hidrofílicos NH y CO (C<sub>16</sub>His); y iii) tipo GBA (C<sub>6</sub>C<sub>22</sub>C<sub>6</sub>), con un espaciador

de C<sub>22</sub> y cadenas muy cortas de C<sub>6</sub>, muy novedoso, en el sentido de que la existencia de un espaciador tan largo abre la vía de formación de monocapas en vez de bicapas lipídicas. Por otra parte, dentro de la familia de vectores macrocíclicos con matriz lipídica, en esta Tesis se ha trabajado con ciclodextrinas policatiónicas funcionalizadas en sus dos entradas (paCDs), en una con grupos que portan la carga positiva necesaria, y en la otra con cadenas hidrofóbicas que le confieren la capacidad para autoagregarse como los vectores lipídicos. En particular, la capacidad de los vectores ADM70, ADM105 y PBO234 para transfectar distintos tipos de células cancerígenas de forma segura estaba ya documentada en la literatura, por lo que en esta Tesis se ha intentado correlacionar ese potencial con una rigurosa caracterización electroquímica y estructural, por una parte, y con la composición de la corona de proteínas adsorbida sobre la superficie de los CDplejos (complejos paCD-pDNA) cuando éstos son previamente incubados con suero humano durante 1 hora. Ambos planteamientos son clave para el diseño racional de nuevos vectores no virales, ya que conocer la correlación entre la estructura y la actividad biológica del vector permite predecir qué cambios estructurales pueden devenir en una mejora futura en las prestaciones. Y conocer la influencia del medio biológico en tales prestaciones, es crucial para elevar los estudios de *in vitro* a *in vivo*, y, finalmente, a ensayo clínico.

Como se ha comentado ya con anterioridad en esta Tesis, los sistemas lipídicos son normalmente mezcla de dos lípidos: uno, el catiónico, que le confiere al vector la carga positiva necesaria, y otro, el zwitteriónico, que no aporta carga a pH fisiológico, comportándose, a la postre, como un lípido neutro. En la práctica totalidad de las investigaciones en este campo, el lípido neutro escogido es el DOPE, por su conocida acción fusogénica, facilitadora de la fusión con las membranas celulares y, potenciador, por tanto, del proceso de internalización celular por endocitosis. De hecho, todos los vectores lipídicos utilizados en esta Tesis Doctoral (en lo que respecta a la transfección de pDNAs) son una mezcla de cualquiera de los lípidos catiónicos antes mencionados y el DOPE, a distintas proporciones de ambos, siendo precisamente la composición del sistema mixto una de las variables secuenciadas en el estudio. Por el contrario, los vectores macrocíclicos (paCDs) han sido utilizados sin la presencia de DOPE, por dos razones fundamentales: i) los estudios previos reportados en la literatura estaban hechos en ausencia de DOPE, y la idea era correlacionar esa actividad reportada con parámetros biofísicos y bioquímicos del sistema; y ii) era interesante verificar hasta qué punto la presencia de DOPE era imprescindible, como se venía pensando hasta ahora.

En cualquiera de los casos, trabajando tanto con los vectores lipídicos tipo GCL o GBA o con los vectores macrocíclicos tipo paCD, la formación del complejo vector-pDNA es un proceso espontáneo que se debe esencialmente a una fuerte interacción electrostática entre los componentes del complejo (vector catiónico y plásmido de DNA) de cargas opuestas. El incremento entrópico, originado por la liberación de contraiones por ambas especies, es la fuerza conductora de la asociación entre el vector catiónico y el plásmido. Es obvio que el estudio debe empezar siempre por una detallada caracterización electroquímica que permita conocer las cargas efectivas tanto del vector como del plásmido. Los resultados obtenidos en los últimos años apuntan a que las cabezas polares de los lípidos catiónicos utilizados para preparar los lipoplejos (complejo vector lipídico-pDNA)

poseen una carga efectiva que en algunos casos coincide con su carga nominal (+1 para los lípidos monovalentes CL, +2 para los divalentes, GCL o GBA, +n para los multivalentes, MVCLs), pero que en la mayoría de los casos es menor. Efectivamente, los vectores lipídicos utilizados en esta Tesis Doctoral han resultado tener cargas efectivas positivas prácticamente iguales ( $C_{16}His$ ,  $q_{eff, C_{16}His}^+ = 1,9$ ), algo inferiores (12PH12,  $q_{eff, 12PH12}^+ = 1,6$  y/o  $C_6C_{22}C_6$ ,  $q_{eff, C_6C_{22}C_6}^+ = 1,4$ ) o muy inferiores (paCDs,  $q_{eff, ADM70}^+ = 4,6$ ,  $q_{eff, ADM105}^+ = 4,7$ ,  $q_{eff, PBO234}^+ = 1,7$ ) a las nominales. Por otra parte, se ha confirmado en esta Tesis Doctoral que la carga negativa efectiva del plásmido,  $q_{eff, pDNA}^-$ , es menor o incluso mucho menor que la nominal, -2/bp. Los plásmidos, al adoptar conformaciones superenrolladas (sobre todo en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica) presentan una menor carga negativa efectiva que los DNAs lineales ( $q_{lineal, DNA} = -2$  /bp) porque parte de los contraiones permanecen neutralizando los grupos fosfatos, sin ser desplazados por las cargas positivas de los lípidos. Por consiguiente, para una misma cantidad de DNA, la isoneutralidad y por tanto la carga neta positiva necesaria, se alcanzan con una menor cantidad de vector catiónico, reduciendo así su citotoxicidad y alcanzando niveles de eficacia transfectora adecuados y superiores a los de los estándares habitualmente utilizados. Quizás una de las aportaciones más relevantes de nuestro grupo de investigación al avance en este campo haya sido, precisamente, concienciar a la comunidad científica de la necesidad de trabajar siempre con cargas efectivas, habida cuenta de que son diferentes a las nominales. Asimismo, se ha reforzado con esta Tesis Doctoral la idea, apuntada también por nuestro grupo de investigación en tesis anteriores, de que DNAs lineales y plásmidos de DNA tienen comportamientos electroquímicos completamente diferentes, por lo que resulta crucial llevar a cabo el estudio biofísico con el mismo plásmido pDNA con el que luego se va a transfectar las células. Quizás parezca muy obvio, pero la realidad es que todavía a día de hoy se encuentran numerosas publicaciones en la literatura que utilizan un DNA lineal en la caracterización biofísica y un plásmido de DNA en la evaluación bioquímica. Por el contrario, el comportamiento de plásmidos distintos (como los utilizados en esta Tesis, uno que codifica a GFP y otro que lo hace a Luciferasa) no presenta claras diferencias desde el punto de vista biofísico.

El conocimiento de las cargas efectivas y las razones de isoneutralidad, me ha permitido conocer con precisión las composiciones potencialmente óptimas del lipoplejo o CDplejo para los posteriores estudios estructurales y bioquímicos.

Es destacable que todos los vectores utilizados se han revelado como eficaces agentes de compactación de los plásmidos utilizados y de protección frente a la acción degradante de las DNAsas. Esta información es importante para futuros estudios *in vivo*.

Desde el punto de vista estructural, todos los complejos vector catiónico-pDNA estudiados se autoagregan en fases multilamelares de cristal líquido liotrópico  $L_\alpha$ , caracterizadas por la alternancia de bicapas lipídicas de vector con un patrón de apilamiento multilamellar, y monocapas acuosas donde se disponen los plásmidos superenrollados. Tan sólo en el caso del lípido gemini bolanfilico, GBA ( $C_6C_{22}C_6$ ), los resultados son compatibles con este esquema estructural pero también lo son con la formación de monocapas de espaciador ( $C_{22}$ ), típico

comportamiento, por otra parte, de los lípidos bolaformes (BAs). En cualquiera de los casos, los resultados de SAXS y crio-TEM son concluyentes y consistentes, y permiten tener una visión global bastante precisa de las estructuras que se forman. Es destacable que en los sistemas lipídicos mixtos, se encuentra la fase  $L_{\alpha}$  a todas las fracciones molares  $\alpha$  de lípido catiónico, desde las mezclas en las que el DOPE es mayoritario ( $\alpha = 0,2$ ) hasta aquellas en las que el DOPE es minoritario ( $\alpha = 0,7$ ) pasando por la mezcla equimolecular ( $\alpha = 0,5$ ). También es la estructura encontrada para los CDplejos, en los que no hay DOPE. Ambas evidencias permiten concluir que la presencia de DOPE en el sistema lipídico y su proporción (contenido) no parece ser determinante para que los complejos resultantes se auto-agreguen siguiendo el patrón multilamelar anteriormente referido.

Con respecto a la actividad biológica de los lipoplejos y CDplejos estudiados, es destacable que los experimentos de FACS y/o luminometría ponen de manifiesto que la capacidad de todos los vectores estudiados es, cuanto menos, comparable a la presentada por el estándar universal utilizado en este tipo de estudios, la Lipofectamina 2000. Es importante reseñar que la comparación entre unos vectores y otros debe hacerse siempre en referencia al control, ya que los resultados obtenidos en experimentos de transfección celular hechos en condiciones diferentes y líneas celulares distintas, no son nunca cuantitativamente comparables. Con esta premisa en mente, lo que sí resulta obvio al analizar globalmente las tasas de TE (eficacia de transfección) obtenidas, es que si bien el lípido gemini 12PH12 y el gemini bolanfílico  $C_6C_{22}C_6$  presentan niveles de TE comparables a los del control, los obtenidos por el lípido gemini con cabezas de His ( $C_{16}His$ ) o por las paCDs (en particular, la ADM70) son mejores o mucho mejores que el estándar, respectivamente. Aunque la discusión detallada de los resultados se ha incluido dentro de cada apartado, se puede apreciar en términos generales que en el caso de los sistemas lipídicos mixtos, las composiciones en las que DOPE era mayoritario ( $\alpha = 0,2$ ) y/o las mezclas equimoleculares han sido las que han arrojado mejores índices de transfección. Este comentario no aplica a las paCDs puesto que no van acompañadas de DOPE. En todos los casos llama la atención que los mejores resultados en la eficacia de la transfección se han obtenido a relaciones de carga efectivas  $\rho_{eff}$  medias o incluso altas, con respecto a la isoneutralidad ( $\rho_{eff} = 1$ ), sin que por ello se haya visto comprometida la viabilidad celular de las células utilizadas. Nótese cómo, de hecho, en el caso de las paCDs, los mejores niveles de TE se han encontrado para  $\rho_{eff} = 50$ . Esta evidencia nos sorprendió, ya que siempre habiéramos tendido a predecir que a esas relaciones de carga la citotoxicidad del vector sería elevada. Y lo cierto es que no ha sido así, ya que, sin entrar en la comparación detallada y cuantificada que se ha ido incluyendo en cada apartado, una observación global y general de los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular me permiten concluir que todos los vectores utilizados en esta Tesis Doctoral son seguros para las células, con % de viabilidad celular, que, salvo algún caso puntual a alguna condición particular de  $\alpha$  o  $\rho_{eff}$ , superan el 80%, umbral mínimo admitido por la comunidad científica en este campo para considerar al vector con apto para transfectar *in vivo*. Además, en todos los casos, las viabilidades celulares (80-100 %) son comparables o mejoran las obtenidas para el control Lipofectamina en las mismas condiciones experimentales.



A la vista de este conjunto global de información biofísica y bioquímica, de todos los vectores catiónicos utilizados y estudiados en esta Tesis Doctoral, con o sin DOPE, destacan esencialmente dos, cada uno perteneciente a las dos grandes familias de vectores escogidos: i) el GCL con restos de His en las cabezas ( $C_{16}His$ ) separados por un espaciador que incluye grupos NH y CO y unidas a sendas cadenas de 16C, perteneciente a la familia de vectores lipídicos; y ii) la paCD ADM70, de la familia de vectores macrocíclicos con matriz lipídica.

En el primero de los casos ( $C_{16}His$ ), es destacable que un lípido gemini también con restos de aminoácido (en concreto de Lys), mezclado también con DOPE y caracterizado en una tesis anterior del grupo, no consiguió transfectar células con una eficacia de transfección siquiera comparable al control. Aunque son lípidos estructuralmente diferentes, quizás la mayor diferencia se encuentra en cómo están dispuestas las cargas positivas en las cabezas del GCL: en el caso del que incorpora restos de Lys, la carga positiva es la correspondiente a un grupo de amonio cuaternario convencional, mientras que en el caso del GCL que incorpora restos de His en las cabezas (el estudiado en esta Tesis Doctoral), las cargas positivas están deslocalizadas en los anillos aromáticos de imidazol. No es la primera vez que encontramos esta evidencia: deslocalizar la carga en las cabezas del GCL potencia la capacidad de transfección del vector. Ya se ha comentado, de hecho, con anterioridad en esta memoria cómo el lípido gemini  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  de la serie dihexadecil diimidazol polioxietilen (con  $n = 1, 2$ , o  $3$ ), con cadenas de 16 átomos de C, un espaciador con grupos oxietileno y cabezas imidazol, utilizado en una tesis anterior, superó claramente las prestaciones del control Lipofectamina. De hecho, es el lípido escogido en esta Tesis Doctoral para estudiar el silenciamiento génico, otro de sus objetivos clave. Esta conclusión debe ser, por tanto, tenida en cuenta en futuros diseños y síntesis de nuevos vectores de plásmidos.

Por otra parte, todavía mejores resultados se han encontrado con los vectores macrocíclicos derivados de CDs (esqueleto glicosilado). Su característica anfifilicidad facial, es decir, el hecho de presentar dos anillos funcionalizables, uno con entidades tipo policationico (vectores multivalentes) y otro con cadenas lipídicas más o menos largas, les convierte en vectores génicos muy adecuados para nuestros objetivos. Varias son las razones: i) el vector resultante se autoagrega en medios polares como el fisiológico, presentando buenas aptitudes para biomimetizarse con la membrana celular y atravesarla, dos características que favorecen el proceso de internalización o captación celular; ii) además, su naturaleza glicosilada disminuye el efecto citotóxico; y iii) su habilidad para estabilizar biomoléculas en medios fisiológicos, protegiéndolas de interacciones no específicas con agentes enzimáticos degradantes. Éstas, entre otras, deben ser las razones por las que las paCDs estudiadas en esta Tesis Doctoral (en ausencia de DOPE) han arrojado muy buenos niveles de TE conjugados con altas tasas de viabilidad celular, por encima de las prestaciones del control. Entre ellas, la que, además de estas cualidades, muestra una mayor estabilidad en ausencia y presencia de suero humano y una distribución homogénea del tamaño del CDplejo correspondiente, es la ADM70, que se perfiló desde un principio como el mejor vector de los estudiados.

En vista de los buenos resultados bioquímicos obtenidos, los CDplejos paCD-pDNA fueron los escogidos para llevar a cabo el tercero de los objetivos clave de

esta Tesis Doctoral, la evaluación de la corona de proteínas adsorbida sobre su superficie cuando son incubados con suero humano, y su influencia en las tasas de TE y los niveles de citotoxicidad. Esta información es clave para futuros estudios *in vivo* y posteriores ensayos clínicos, dado que en estos escenarios los vectores génicos tendrán que superar múltiples barreras fisiológicas hasta llegar a su diana, el núcleo celular. Además, es conocido que las prestaciones de los vectores bajan ya *in vitro* cuando el experimento se hace en presencia de suero, por lo que es importante saber cuáles son las razones de esta disminución de actividad biológica. La caracterización de la corona de proteínas ha dado lugar a interesantes conclusiones, que han sido analizadas con detalle en el apartado correspondiente. Es destacable que las proteínas adsorbidas tienen principalmente carga negativa en todos los casos ( $pI < 7$ ), apuntando a las interacciones electrostáticas como fuerzas no covalentes responsables de la interacción entre proteínas y vectores catiónicos. Las proteínas de complemento, lipoproteínas y de coagulación han resultado ser las más abundantes en la corona de las proteínas de las paCDs y sus correspondientes CDplejos, mientras que las inmunoglobulinas, las proteínas de permeabilidad celular y las de fase aguda constituyen una fracción menor. Efectivamente, se ha encontrado que los niveles de eficacia de transfección disminuyen ligeramente en presencia de medios biológicos, es decir, con la corona de proteínas formada, pero, en cualquier caso, siempre han resultado ser superiores a los obtenidos con el control Lipofectamina. Por otra parte, la viabilidad celular de las células utilizadas en este estudio no ha disminuido significativamente en presencia de la corona de proteínas, encontrándose casi todos los valores alrededor de o por encima del 80%. Es importante tener en cuenta, no obstante, que el que la corona de proteínas reduzca la viabilidad celular o, por el contrario, proteja las células, puede ser debido a la composición específica de la corona, y a su compleja relación con el procesamiento de los vectores a cargo de la maquinaria celular. Además, en ausencia de experimentos *in vivo*, la evaluación de la composición de la corona de proteínas no permite obtener conclusiones inequívocas sobre el futuro en aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, direccionalidad, biodistribución, citotoxicidad). En otras palabras, la interpretación del efecto de la corona de proteínas en la viabilidad celular debe hacerse con precaución. En todo caso, el grueso de las evidencias biofísicas y bioquímicas obtenidas en esta Tesis Doctoral, nos permite concluir que las tres paCDs propuestas pueden ser consideradas como nanovectores de ácidos nucleicos potencialmente eficaces y seguros *in vitro* e incluso prometedores nanovectores génicos *in vivo*. Yendo más allá, entre las tres paCDs estudiadas en esta Tesis, la ADM70 parece mostrar las características más favorables para aplicaciones *in vitro* en las que se requiera la presencia de suero humano, lo cual concuerda muy bien con la superioridad de esta paCD en experimentos *in vivo* previos.

Por otra parte, el Objetivo 2 de esta Tesis ha estado dirigido al uso de RNAs cortos (siRNAs) para ser transfectados a las células y así silenciar genes específicos defectuosos. Esta prometedora metodología de terapia génica requiere nanovectores de siRNA con un alto grado de eficacia. Para llevar a cabo este estudio de silenciación, en la presente Tesis se han seleccionado los lípidos gemini de la serie  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  con  $n = 1, 2$  o  $3$ , cuya elevada eficacia (mezclados con DOPE) como agentes de transfección de plásmidos DNA ya fue contrastada en una Tesis anterior de nuestro grupo. Sin embargo, y puesto que el siRNA

utilizado sólo tiene 20-24 pares de bases, en los estudios de silenciación, el agente coadyuvante que se viene utilizando en la bibliografía es el monooleil glicerol (MOG), lípido neutro altamente biocompatible que forma fases cúbicas bicontinuas de cristal líquido liotrópico. No obstante, hay que remarcar que para que estas fases cúbicas que forma el MOG puedan seguir estando presentes en los lipoplejos, se requiere que el ácido nucleico no posea cadenas largas como los plásmidos DNA sino cadenas cortas como los siRNA. Como ya se discutió ampliamente en la sección de resultados, la presencia de fases cúbicas bicontinuas giroides aumenta la capacidad de la membrana para formar poros, y a la vez se incrementa la atracción electrostática del vector catiónico con la membrana endosomal negativa. Como resultado, hay una promoción de la fusión entre los lipoplejos CL/MOG-siRNA y la membrana endosomal celular, lo que conduce a una liberación más eficaz del siRNA en el citoplasma celular.

Las anteriores consideraciones han sido las que han llevado a elegir en esta Tesis los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  /MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  y  $3$ , para comprobar si mejoran los agentes de silenciación conocidos hasta la actualidad. Los difractogramas de SAXS de estos lipoplejos han confirmado la presencia de: i) dos fases cúbicas de cristal líquido liotrópico a baja fracción molar del lípido catiónico gemini ( $\alpha$  bajo, es decir, alto contenido de MOG); una bicontinua giroide y otra micelar, que pertenecen a los grupos espaciales cristalográficos  $Ia3d$  y  $Pm3n$ , respectivamente; y ii) una fase multilamelar  $L_\alpha$  a fracciones molares del lípido moderadas y altas (moderado o bajo contenido de MOG), que ha sido confirmada con las micrografías de crio-TEM en las que se han encontrado estructuras multilamelares de tipo “cluster” y “fingerprint”. Los tres tipos de estructuras se han encontrado en los lipoplejos con los tres espaciadores, desde el más corto ( $n = 1$ ) al más largo ( $n = 3$ ). Otra característica de los lipoplejos que potencialmente favorece la transfección es su fluidez. En este sentido, los resultados de anisotropía de fluorescencia,  $r$ , que se correlacionan con el grado de fluidez de la bicapa lipídica del vector han confirmado a los tres lipoplejos de la serie como poseedores de bicapas con un alto grado de fluidez, ya que  $r$  ha resultado ser extraordinariamente bajo ( $0,03 < r < 0,13$ ), mucho menor incluso que los valores considerados como óptimos para membranas lipídicas muy fluidas ( $r \sim 0,15-0,20$ ). Esta elevada fluidez se ha atribuido a dos factores: a) la presencia de un enlace *cis* en la posición 9-10 de la molécula MOG que le confiere un carácter fusogénico elevado, incluso superior al DOPE, y b) la presencia de las mencionadas fases cúbicas bicontinuas.

Todas las evidencias positivas obtenidas con el estudio biofísico de estos lipoplejos, cara a su potencial actividad como agentes silenciadores del RNA, se ha confirmado con el estudio bioquímico realizado en distintas líneas celulares cancerígenas en presencia de suero. De hecho, los tres lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  /MOG-siRNA con  $n = 1, 2$  y  $3$ , muestran una elevada actividad ( $> 80\%$ ) como agentes de silenciamiento. Las óptimas formulaciones se han encontrado a baja fracción molar del lípido mixto ( $\alpha = 0,12-0,15$ ), justo a las que se forman las estructuras cúbicas bicontinuas. Además, esta elevada eficacia como agentes de silenciación viene acompañada por un alto grado de viabilidad celular en todas las líneas celulares analizadas (80-100%). Por último, señalar que el resumen del estudio biológico realizado indica que el espaciador más corto ( $n = 1$ ), una baja fracción molar de lípido catiónico gemini ( $\alpha = 0,12-0,15$ ) y una

moderada relación efectiva de cargas ( $\rho_{\text{eff}} = 6-8$ ) del lipoplejo conducen a las óptimas formulaciones. Se puede concluir que estas formulaciones son, a fecha de hoy, las que han aportado las mejores prestaciones en el proceso de silenciamiento del siRNA y colocan, por tanto, a estos lipoplejos en la primera línea de vectores con potencial uso para ser utilizados en ensayos *in vivo*.

Para finalizar esta visión global de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en lo que respecta al Objetivo 1 (Búsqueda de nuevos vectores no virales de plásmidos de DNA), Objetivo 2 (Búsqueda de nuevos agentes terapéuticos: el silenciamiento génico) y Objetivo 3 (Evaluación de la interacción del complejo vector-pDNA con fluidos biológicos y de su influencia en las prestaciones biológicas del vector), me gustaría destacar que:

- Si bien la búsqueda no acaba, en tanto en cuanto, se debe perseguir el reto de ir mejorando progresivamente el binomio alta tasa de TE-baja citotoxicidad, los resultados de esta Tesis Doctoral en este apartado han aportado importantes datos de hacia dónde deben dirigirse los esfuerzos de diseño y síntesis de nuevas familias de vectores génicos no virales. Obviamente, el foco futuro ha de ponerse en la transfección eficaz y segura de genes terapéuticos, con el objeto de reemplazar secuencias de DNA específicas, responsables de una enfermedad concreta.
- Por otra parte, puesto que el silenciamiento génico se consolida como una alternativa terapéutica de gran potencial en la medicina moderna, es crucial que también se diseñen y sintetizen vectores eficaces y seguros capaces de insertar siRNAs específicos en las células, con el objeto de degradar el mRNA de un gen específico, silenciando o bloqueando de esta forma la síntesis de proteínas responsables de la enfermedad.
- Sin duda, lo que ven las células *in vivo* es la entidad “vector-ácido nucleico-corona de proteínas”. Habida cuenta de que la composición de dicha corona puede decidir el destino de ese vector y su potencial, queda demostrado que la evaluación de esa composición y, si fuera posible, también de su evolución dinámica, resultan cruciales para poder elevar los estudios aquí presentados a un futuro escenario *in vivo* y posterior ensayo clínico.

# CAPÍTULO 7

CONCLUSIONS

## 7.- CONCLUSIONS

---

Pharmaceutical industry invests a vast amount of resources on high-throughput drug discovery technologies, with sophisticated strategies that cannot simply rely on the design of a single candidate programmed to develop the required task. This is precisely what made nucleic acids an attractive source of therapeutic agents. The intimate structure-activity relationship (SAR) and their highly specific mode of action theoretically permit to exploit cellular machinery in a predictable fashion to either stimulate or silence the expression of virtually any protein, with reduced toxicity and fewer side effects. These issues are the basis of **gene therapy**, an exciting branch of medicine with the objective of curing diseases, such as genetic, neurologic, cardiovascular, infectious, or carcinogenic, at a molecular level, by repairing damaged cellular DNA. In the case of inherited disorders, the introduction of a normal copy of the affected gene can effectively restore healthy cell functioning. However, for the treatment of acquired disorders, such as cancer and infectious diseases, effective potential strategies involve not only the introduction of a therapeutic gene, but also the silencing of the expression of an abnormal gene, whose expression is enhanced in the diseased tissue or cells. In the development of the first approach, the task is introducing an adequate plasmid DNA (pDNA), of several thousand base pairs, inside the cellular cytoplasm, while the second approach is based on the insertion of a small interfering RNA (siRNA), of around 19-25 base pairs.

Conventional drugs consist of bioactive species and a carrier, the former being the center of the design strategies. However, in the case of biomolecular drugs, such as nucleic acids, the carrier becomes a decisive protagonist, since they allow them to overcome the physiological barriers and reach its target in a fully functional form to carry out its designed therapeutic function, given that nucleic acids are easily degraded by nucleases in biological fluids and their membrane-crossing abilities and cellular uptake are seriously limited by their inherently large size, rigidity and negative charge. The *gene carriers* or *gene vectors* are usually classified in two groups: viral and non-viral. Viral gene vectors are usually more effective but they may cause a series of serious adverse effects in the organism, such as immunogenicity, oncogenicity, and potential virus recombination problems. Accordingly, researchers working in this area have focused all their efforts in the development of nonviral carriers that usually suffers from low transfection levels. And this is, precisely, the main objective of this PhD Thesis, to look for non-viral vectors capable of compacting, protecting and transporting genetic material, either pDNAs or siRNAs, in an efficient and safe way, trying to improve the outcomes of the current gen-carrier systems.

The main conclusions of this PhD Thesis are resumed in three groups, related with the three initial objectives, as follows:

**i) Objective 1: Search for new non-viral gene vectors, capable of transfecting pDNAs into different cell types.**

With the aim of improving the efficacy of the current vectors (either viral or nonviral), different types of molecules have been designed, synthesized and characterized, both from a biophysical and biochemical points of view. Two families of nonviral vectors have been proved in this PhD Thesis: lipid vectors and macrocyclic vectors with a lipid matrix.

In the first group, attention has been essentially focused on cationic gemini lipids (GCLs) of different types: i) GCL type (12PH12), with conventional heads (quaternary ammonium type) and aromatic spacers, little tested in the literature; ii) GCL type (C<sub>16</sub>His), but incorporating His residues (characterized by having imidazole groups) in the heads and spacers with NH and CO hydrophilic groups; and iii) GBA type (C<sub>6</sub>C<sub>22</sub>C<sub>6</sub>), with a very long spacer (22C) and very short chains (6C), quite new in the field, in the sense that the existence of such a long spacer opens a way to the formation of monolayers rather than lipid bilayers.

Within the context of macrocycle-based gene vectors, three polycationic amphiphilic cyclodextrins (paCDs), i.e. ADM70, ADM105 and PBO234, bearing a common tetradecahexanoyl multitail domain at the secondary face and differing in the topology of the cluster of amino groups at the primary side have been selected for this study.

In either case, working with the GCL or GBA type lipid vectors or the paCD macrocyclic vectors, the formation of the vector-pDNA complex is a spontaneous process which is essentially due to a strong electrostatic interaction between the components of the complex, of opposite charges. The entropic increase caused by the release of counterions by both species is the driving force of the association between the cationic vector and the plasmid. It is obvious that the study must always begin with a detailed electrochemical characterization that allows knowing the effective charges of both the vector and the plasmid, which in the present case have resulted to be lower or much lower than the nominal ones, either for the plasmid and the cationic vectors.

These results confirm that, when the plasmid is compacted by the gene vector, it retains a large amount of Na<sup>+</sup> ions. This fact is very relevant since implies that, for the same amount of DNA, the isoneutrality and, in turn, the required positive net charge, are reached with a smaller amount of cationic vector, thus reducing its cytotoxicity.

Perhaps one of the most relevant contributions of our research group to progress in this field has been precisely to make the scientific community aware of the need to always work with effective charges, given that they are different from nominal ones. Also, it has been reinforced with this PhD Thesis the idea also pointed by our research group in previous theses that linear DNAs and plasmids DNA have completely different electrochemical behaviors, so it is crucial to carry out the biophysical study with the same plasmid pDNA with which the cells will then be transfected.

It is noteworthy that all the new non viral vectors reported in this PhD Thesis have been shown to be able to efficiently compact and protect the plasmid DNA

against the degrading action of the DNAs. This information is important for future studies *in vivo*.

From the structural point of view, all the cationic vector-pDNA complexes studied in this PhD Thesis are self-aggregated in  $L_\alpha$  multilamellar phases of lyotropic liquid crystal, characterized by the alternation of lipidic bilayers of the vector, with a multilamellar stacking pattern, and aqueous monolayers where the supercoiled plasmids are located. This conclusion applies irrespectively of the molar composition of the lipid mixture, in the case of lipid vectors.

With respect to the biological activity of the lipoplexes and CDplexes studied, it is remarkable that FACS (GFP expression in lipoplexes formed with plasmid pEGFP-C3) and/or luminometry experiments (luciferase expression in lipoplexes with plasmid pCMV-Luc) show that the capacity of all vectors to transfect different types of living cells (HeLa, COS-7, MCF-7) is at least comparable to that presented by the universal standard used in this type of studies, Lipofectamina 2000.

It is remarkable that the comparison among different vectors should be made always with respect to the control, since the results obtained in cell transfection experiments made under different conditions and different cell lines are never quantitatively comparable. With this premise in mind, what is obvious in the overall analysis of the TE (transfection efficiency) results is that, although the gemini lipid 12PH12 and the bolaform gemini lipid  $C_6C_{22}C_6$  have shown comparable TE levels to those of the control, those obtained by the gemini lipid with His residues as polar heads ( $C_{16}His$ ) or by the paCDs (in particular ADM70) are better or much better than the standard, respectively. The best performances have been obtained at low-to-moderate molar compositions ( $\alpha$ ) of the cationic lipid (when DOPE is present) and, surprisingly, at moderate-to-high effective charge ratios ( $\rho_{eff}$ ), without compromising cell viability.

In fact, a global observation of the cell viability results allow concluding that all the vectors used in this PhD Thesis are safe for the cells, with cell viability levels exceeding 80%, a value that is considered a minimum threshold to consider the vector suitable for transfecting *in vivo*. In addition, in all cases, cellular viabilities (80-100%) are comparable or better than those obtained by Lipofectamine 2000, at the same experimental conditions.

In view of this global picture of biophysical and biochemical information, among all the cationic vectors used and studied in this PhD Thesis, with or without DOPE, there are two that essentially stand out, each belonging to the two families of vectors chosen:

- **$C_{16}His$** : GCL with His residues in the heads, belonging to the family of lipid vectors, characterized by the fact that the positive charge is delocalized (imidazole groups). This conclusion is especially relevant when considering that another GCL with Lys aminoacid residues in the polar heads was already checked by the group in a previous thesis without any success on transfecting cells. Again, we have reached the conclusion that delocalizing the charge of the cationic vector improves TE outcomes. This conclusion should therefore be taken into account in future designs and syntheses of new nonviral vectors.



•**ADM70:** paCD belonging to the family of macrocyclic vectors with lipid matrix, characterized by a facial amphiphilicity that permits to functionalize one ring with polycationic type entities and the other one with more or less long lipid chains. This particular structure converts them into potentially suitable nonviral vectors for several reasons: 1) the resulting vector self-aggregates in physiological polar media thus presenting good ability to biomimic the cell membrane and cross it, two characteristics that favor the cellular uptake process; 2) its glycosylated nature decreases the cytotoxic effect; and 3) their ability to stabilize biomolecules in physiological media, protecting them from non-specific interactions with degrading enzymatic agents. In addition to these qualities, ADM70 shows a greater stability in the absence and presence of human serum and a homogeneous size distribution.

## ii) **Objective 2: Search for new therapeutic agents (gene silencing).**

A second point in this work has been the **search of new therapeutic agents**, using small interfering RNAs (siRNAs), whose objective is to silence a specific defective gen. For this purpose, the lipoplexes formed by: a commercial siRNA (of 20-22 base pairs), a lipid of the series  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  (with  $n = 1, 2$ , or  $3$ ), that have been proved as good transfection agents of pDNA in a previous thesis of the group, and a neutral coadjuvant lipid as monooleylglycerol (MOG), have been fully characterized from both biophysical and biochemical standpoints. The idea was to establish: i) the relationship between size, structure, fluidity and the interaction between the components of the gene vectors; ii) to analyze the cellular uptake/delivery of siRNA; and iii) to report the EGFP knockdown efficacy in a biocompatible manner.

This study shows that the effective charges of the three cationic lipids of the series match their nominal ones (-2 bp).

SAXS diffractograms have shown the formation of three lyotropic liquid crystal phases that coexist at certain GCL molar fractions of the mixed lipids in the nanovector. At low  $\alpha$  (high content on MOG), two cubic phases are present: one bicontinuous double gyroid cubic phase ( $Q_{II}^G$ ) and a micellar cubic phase, belonging to the  $Ia3d$  and  $Pm3n$  crystallographic space groups, respectively. The preference of MOG to promote cubic bicontinuous phases increases the ability of the lipid membrane to form pores, promoting the fusion between the outer membranes of GCL-siRNA complexes and the endosomal membrane with an efficient delivery of siRNA in the cytoplasm. When the GCL molar fraction increases, a phase transition from both,  $Ia3d$  and  $Pm3n$ , cubic phases into lamellar  $L_\alpha$  one occurs. Cryo-TEM experiments conclude that with the increase in the spacer length ( $n$ ) of the GCL, certain contributions of cluster-type and fingerprint multilamellar patterns are observed.

The *in vitro* biological studies indicate that a short spacer, a very low GCL molar fraction, and a moderate effective charge ratio of the lipoplex, increase the silencing activity of these lipidic nanovectors. In the presence of serum, the three  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA lipoplexes, with  $n = 1, 2$ , or  $3$ , show maximum EGFP down-regulation (>80%, better than with the control) in EGFP expressing

cancer cells, at GCL molar fractions of  $\alpha = 0.12$  and  $0.15$ , and at moderate effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 6-8$ ).

It can be concluded that, in these optimum conditions, the siRNA is compacted by the GCL/MOG nanovectors by forming two cubic structures (*Ia3d* and *Pm3n*) that seem to be well correlated with a significant siRNA cellular uptake and delivery, accompanied by high cell viability inputs.

In summary, based on the *in vitro* results reported in this work we envisage on the utility of these biocompatible lipidic nanocarriers as truly attractive for the siRNA delivery at *in vivo* platforms.

ii) **Objective 3: To get a better comprehension of the nanovector's behavior when is introduced into bloodstream.**

This study was aimed to provide new insights in the fascinating processes governing pDNA complexation by monodisperse vectors of the paCD family, in an attempt to delineate the mechanisms whereby differences in molecular structure translates into differences in transfection capabilities. For that purpose, three CD-based compounds (**ADM70**, **ADM105** and **PBO234**) have been thoroughly checked as potential nanocarriers of a pEGFP-C3 plasmid that codes for GFP expression to the interior of HeLa and MCF-7 cancer cells, both in the absence and presence of human serum. In a first level of organization, the vector molecular structure influences the effective positive charge available for interacting with the plasmid as well as the effective negative charge of the plasmid in the nanoaggregates. In fact, effective charges are lower than nominal ones, as previously commented, both for the CD-based vectors (around 30% for ADMs and 25% for PBO234), and also for the pDNA, which renders a low percentage of its negative charge (less than 15%) when it is compacted by the nanocarriers. This is a potentially favourable finding since the weaker the anionic character of the DNA, the lower the amount of cationic vector needed to formulate the nanocomplexes, thus decreasing the cytotoxicity of the vector and increasing their potential output as safe and effective vehicles of nucleic acids. On the other hand, SAXS and cryo-TEM studies have shown that **ADM70**-pDNA, **ADM105**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes are structured according to a multilamellar lyotropic liquid crystal phase ( $L_a$ ). Two different multilamellar phases are distinguished, nonetheless, on cryo-TEM micrographs (CT-type and FP-type nanoaggregates), in coexistence with unilamellar vesicles of self-aggregated exceeding paCDs without pDNA compacted. Although the Janus feature seems to warrant a multilamellar arrangement for the paCD-pDNA nanocomplexes in all cases, their stability and homogeneity can be significantly different depending on the topology of the multivalent cationizable domain in the paCD entity.

In the presence of human plasma, a second level of organization takes place involving the interaction with serum proteins, giving rise to multicomponent nanoassemblies equipped with a protein corona whose composition varies from a paCD formulation to another. The protein corona (PC) characterization has also driven to interesting conclusions. The adsorbed proteins have mostly a negative charge in all the cases ( $pI < 7$ ), pointing to the electrostatic interactions as the driven non-covalent forces between proteins and the cationic vectors.

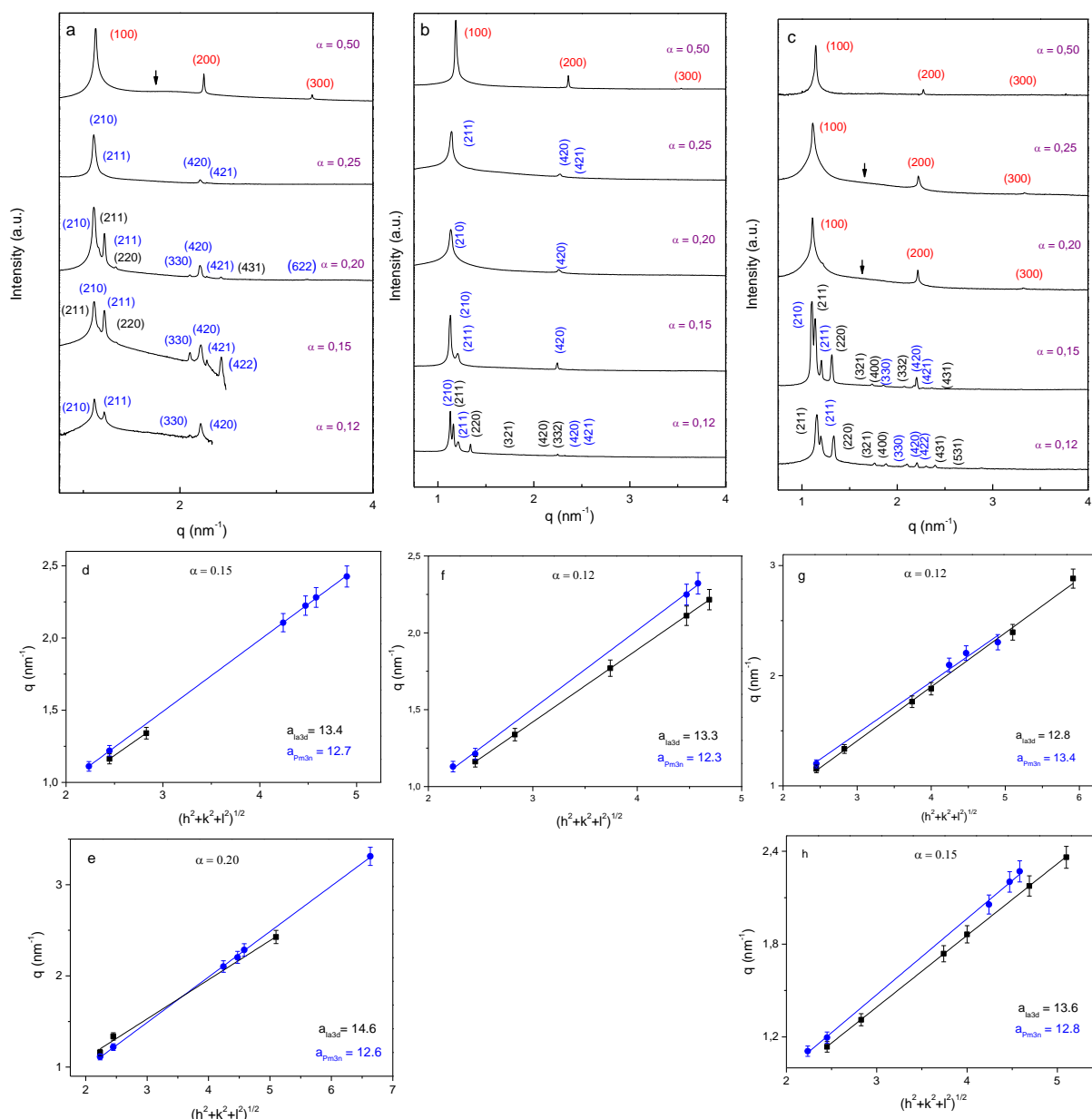
Complement, lipoprotein and coagulation were found to be the most abundant types of proteins within the corona of the Janus paCDs and the corresponding CDplexes, whereas immunoglobulins, tissue leakage and acute phase proteins constituted a minor fraction of the PC. At moderate-to-high charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 25$  and 50), the bare CDplexes herein reported seem to transfect either HeLa or MCF-7 cancer cells more efficiently than Lipofectamine, and with high cell viabilities ranged from 80 to 100%. These transfection efficiencies were found to slightly decrease in the presence of biological media (HP), but in any case the values found were higher than those obtained with the control Lipofectamine. However, the effect of PC on the cell viability of CDplexes is not that easy to interpret. Probably, the specific PC composition and, in turn, its complex effect on nanocarrier processing by cell machinery, play a crucial role, although an accurate mapping of protein binding sites in the PC would be necessary to go further in these conclusions. In any case, the whole body of both biophysical and biochemical evidences obtained in this work allow us to conclude that the three paCDs proposed can be considered as potentially efficient nanocarriers *in vitro* and promising gen vectors for *in vivo* applications. Going further, among the three Janus paCDS nanovectors checked in this work, **ADM70** seem to exhibit the most favourable features for *in vitro* gene therapy applications requiring serum-containing media, in total agreement with the already observed superiority of **ADM70** formulations in *in vivo* transfection studies.

To finish this section, I would like to point out that:

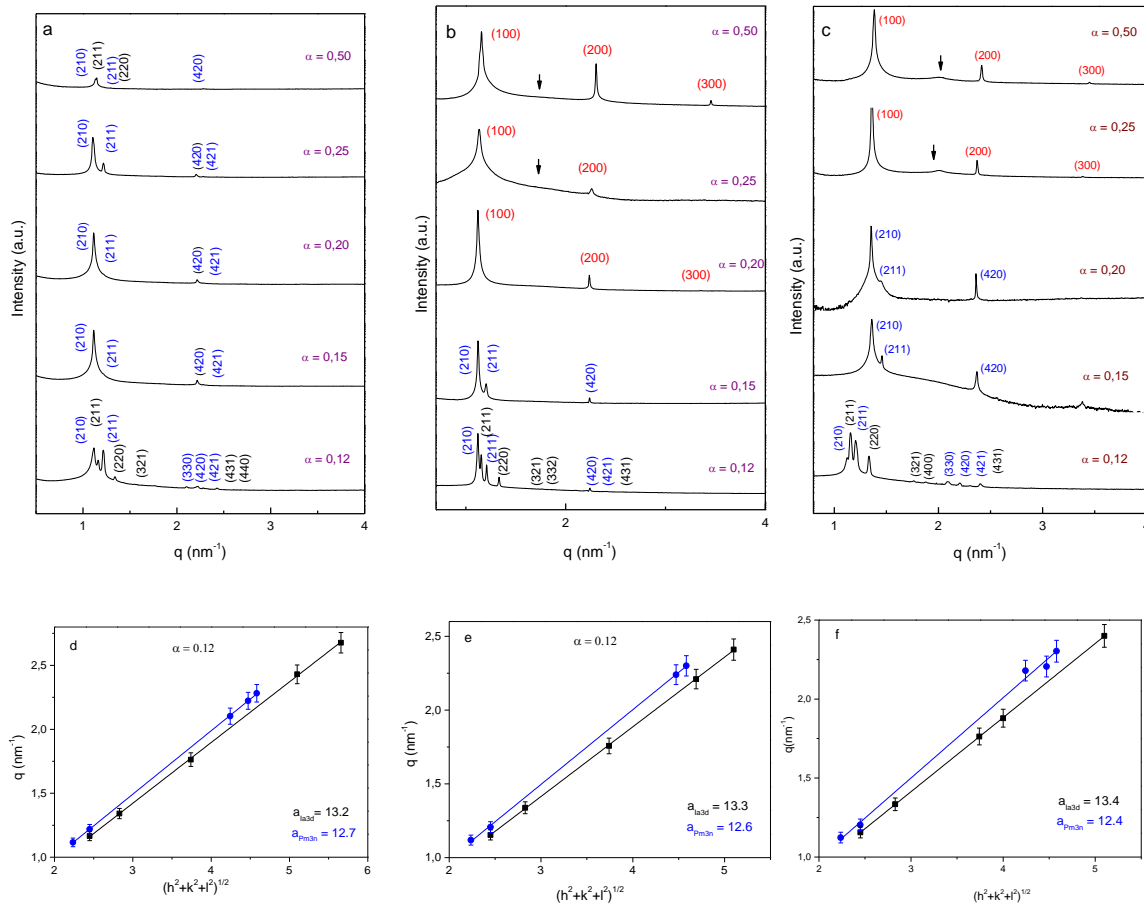
- The results of this PhD Thesis have provided important information of where the design and synthesis of new families of non-viral gene vectors must be directed to. Focus must be put on the effective and safe transfection of therapeutic genes, in order to replace specific DNA sequences responsible for a particular disease.
- On the other hand, since gene silencing is consolidated as a therapeutic alternative of great potential in modern medicine, it is crucial to design and synthesize as well effective and safe vectors capable of inserting specific siRNAs into cells, in order to silence a specific pathogenic gene.
- Undoubtedly, what cells see *in vivo* is the "vector-nucleic acid- protein corona" entity. Given that PC composition can determine the fate of the vector, the evaluation of that composition and, if possible, of its dynamic evolution, are crucial for future *in vivo* experiments and subsequent clinical trials

ANEXO 1

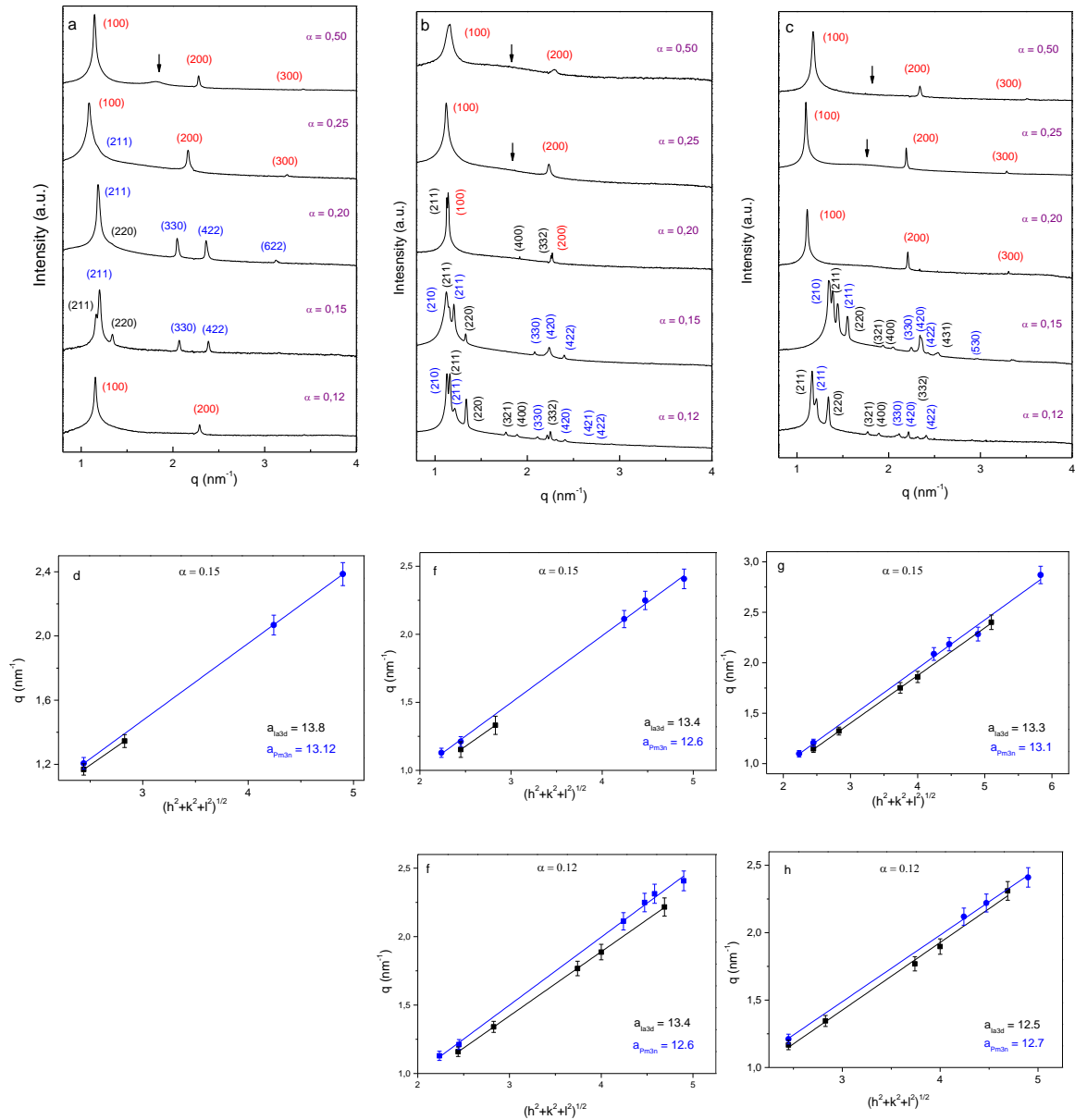
# ANEXO 1



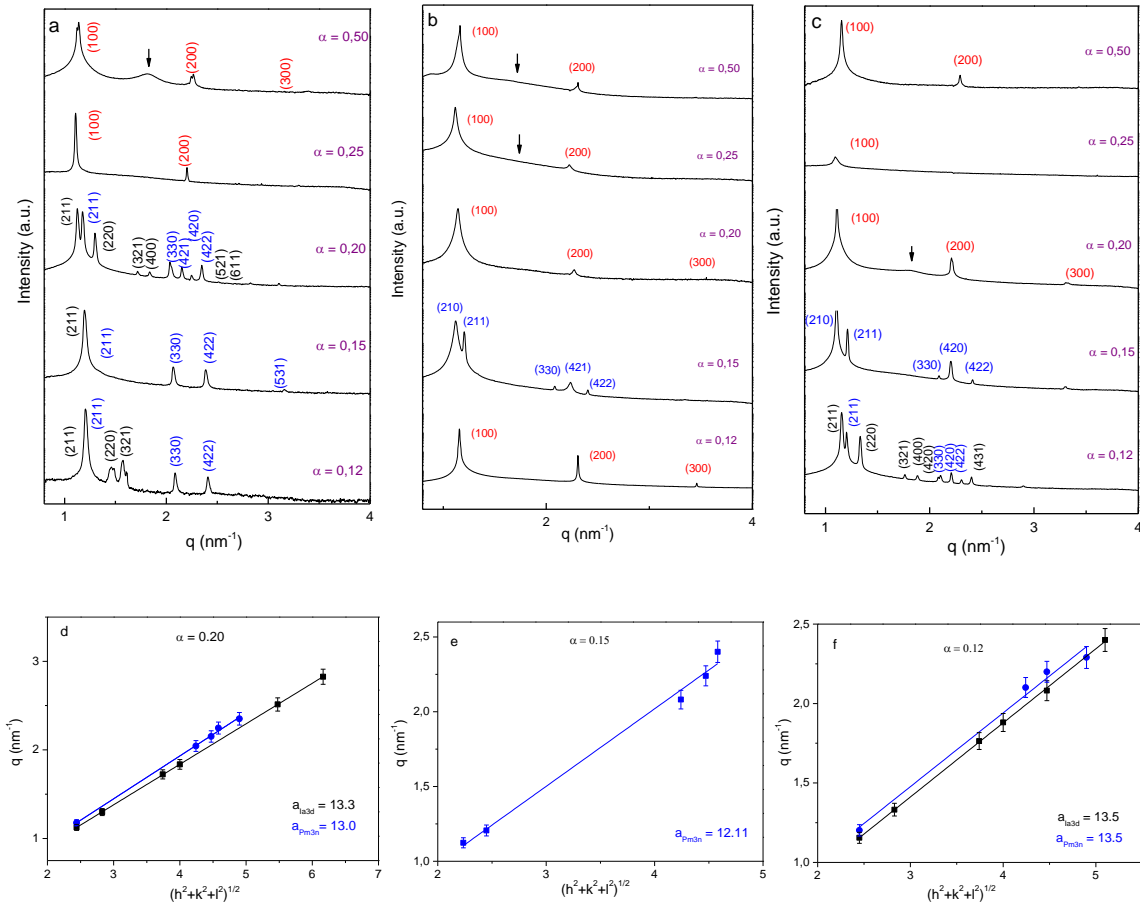
**Figura A1.** Difractograma de SAXS de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4 / MOG-siRNA$  en ausencia de Pluronic F127, a varias composiciones GCL ( $\alpha$ ) y un ratio de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) = 4. (a)  $n = 1$ , (b)  $n = 2$ , y (c)  $n = 3$ . Los índices de Miller  $(hkl)$  corresponden a las estructuras: negra, Ia3d; azul, Pm3n, y roja  $L_\alpha$ . Las flechas indican el pico de correlación pDNA-pDNA en la estructura  $L_\alpha$ . (d-h) Gráficas del factor  $q$  frente a  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  para la fase cúbica Ia3d (cuadrados negros) y Pm3n (círculos azules): (d-e)  $n = 1$ , (f)  $n = 2$ , y (g-h)  $n = 3$ . De la pendiente ( $= 2\pi/a$ ), se ha determinado las dimensiones de (a) de la celda unidad de cada fase cúbica. Los valores (en nm) se señalan en la gráfica.



**Figura A2.** Difractograma de SAXS de los lipoplejos  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG-siRNA}$  en ausencia de Pluronic F127, a varias composiciones GCL ( $\alpha$ ) y un ratio de carga efectiva ( $\rho_{\text{eff}} = 8$ ). (a)  $n = 1$ , (b)  $n = 2$ , y (c)  $n = 3$ . Los índices de Miller  $(hkl)$  corresponden a las estructuras: negra, Ia3d; azul, Pm3n, y roja  $L_\alpha$ . Las flechas indican el pico de correlación pDNA-pDNA en la estructura  $L_\alpha$ . (d-h) Gráficas del factor  $q$  frente a  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  para la fase cúbica Ia3d (cuadrados negros) y Pm3n (círculos azules): (d-e)  $n = 1$ , (f)  $n = 2$ , y (g-h)  $n = 3$ . De la pendiente ( $= 2\pi/a$ ), se ha determinado las dimensiones de (a) de la celda unidad de cada fase cúbica. Los valores (en nm) se señalan en la gráfica.



**Figura A3.** Difractograma de SAXS de los lipoplejos  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA en presencia de Pluronic F127, a varias composiciones GCL ( $\alpha$ ) y un ratio de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ) = 4. (a)  $n = 1$ , (b)  $n = 2$ , y (c)  $n = 3$ . Los índices de Miller  $(hkl)$  corresponden a las estructuras: negra,  $Ia3d$ ; azul,  $Pm3n$ , y roja  $L_\alpha$ . Las flechas indican el pico de correlación pDNA-pDNA en la estructura  $L_\alpha$ . (d-h) Gráficas del factor  $q$  frente a  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  para la fase cúbica  $Ia3d$  (cuadrados negros) y  $Pm3n$  (círculos azules): (d-e)  $n = 1$ , (f)  $n = 2$ , y (g-h)  $n = 3$ . De la pendiente ( $= 2\pi/a$ ), se ha determinado las dimensiones de (a) de la celda unidad de cada fase cúbica. Los valores (en nm) se señalan en la gráfica.



**Figura A4.** Difractograma de SAXS de los lipoplejos  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG-siRNA}$  en presencia de Pluronic F127, a varias composiciones GCL ( $\alpha$ ) y un ratio de carga efectiva ( $\rho_{\text{eff}} = 8$ ). (a)  $n = 1$ , (b)  $n = 2$ , y (c)  $n = 3$ . Los índices de Miller ( $hkl$ ) corresponden a las estructuras: negra, Ia3d; azul, Pm3n, y roja  $L_\alpha$ . Las flechas indican el pico de correlación pDNA-pDNA en la estructura  $L_\alpha$ . (d-h) Gráficas del factor  $q$  frente a  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  para la fase cúbica Ia3d (cuadrados negros) y Pm3n (círculos azules) : (d-e)  $n = 1$ , (f)  $n = 2$ , y (g-h)  $n = 3$ . De la pendiente ( $= 2\pi/a$ ), se ha determinado las dimensiones de (a) de la celda unidad de cada fase cúbica. Los valores (en nm) se señalan en la gráfica.



**Tabla A1.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de la estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)C_2H_4/$ MOG-siRNA, en ausencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

$\rho_{eff}$	$\alpha$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	0.12	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.12 210 12.8	1.22 211	2.11 330	2.22 420						
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.111 210 13.4 12.7	1.163 211	1.219 211	1.341 220	2.106 330	2.224 420	2.281 421	2.426 422		
	0.20	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.11 210 14.6 12.6	1.16 211	1.22 211	1.34 220	2.10 330	2.20 420	2.28 421	2.43 431		
	0.25	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.11 210 12.7	1.21 211	2.21 420	2.27 421						
	0.50	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.12 100 5.6	2.25 200	3.37 300							
8	0.12	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.11 210 13.2 12.7	1.16 211	1.22 211	1.34 220	1.76 321	2.10 330	2.22 420	2.28 421	2.43 431	2.67 440
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.11 210 12.7	1.22 211	2.22 420	2.28 421						
	0.20	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.11 210 12.6	1.22 211	2.22 420	2.28 421						
	0.25	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.11 210 12.7	1.22 211	2.20 420	2.28 421						
	0.50	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.13 210 8.5 12.2	1.15 211	1.29 211	1.61 220	2.22 420					

$q$  in  $nm^{-1}$ ;  $a$  in nm

**Tabla A2.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de la estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_2C_2H_4/$ MOG-siRNA, en ausencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

$\rho_{eff}$	$a$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	0.12	$q$	1.13	1.16	1.22	1.34	1.77	2.11	2.22	2.25	2.32
		(hkl)	210	211	211	220	321	420	332	420	421
		$a_{Ia3d}$	13.4								
		$a_{Pm3n}$	12.3								
	0.15	$q$	1.13	1.22	2.25						
8	0.12	(hkl)	210	211	420						
		$a_{Pm3n}$	12.6								
		$q$	1.13	2.22							
		(hkl)	210	420							
		$a_{Pm3n}$	12.6								
8	0.25	$q$	1.13	2.27	2.32						
		(hkl)	211	420	421						
		$a_{Pm3n}$	12.6								
		$q$	1.18	2.36	3.53						
		(hkl)	100	200	300						
8	0.50	$a_{L_\alpha}$	5.3								
		$q$	1.12	1.15	1.20	1.34	1.76	2.21	2.24	2.3	2.41
		(hkl)	210	211	211	220	321	332	420	421	431
		$a_{Ia3d}$	13.3								
		$a_{Pm3n}$	12.6								
8	0.15	$q$	1.12	1.22	2.23						
		(hkl)	210	211	420						
		$a_{Pm3n}$	12.5								
		$q$	1.12	2.24	2.35						
		(hkl)	100	200	300						
8	0.20	$a_{L_\alpha}$	5.6								
		$q$	1.38	2.26							
		(hkl)	100	200							
		$a_{L_\alpha}$	4.6								
		$q$	1.16	2.32	3.46						
8	0.25	(hkl)	100	200	300						
		$a_{L_\alpha}$	5.4								
		$q$	1.16	2.32	3.46						
		(hkl)	100	200	300						
		$a_{L_\alpha}$	5.4								

$q$  in  $\text{nm}^{-1}$ ;  $a$  in nm

**Tabla A3.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de la estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_3C_2H_4/$ MOG-siRNA, en ausencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

$\rho_{eff}$	$\alpha$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	0.12	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.15 211 12.8 13.4	1.2 211 12.8 13.4	1.33 220 12.8 13.4	1.76 321 12.8 13.4	1.88 400 12.8 13.4	2.09 330 12.8 13.4	2.20 420 12.8 13.4	2.30 422 12.8 13.4	2.39 431 12.8 13.4	2.88 531 12.8 13.4	
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.11 210 13.6 12.8	1.13 211 13.6 12.8	1.19 211 13.6 12.8	1.31 220 13.6 12.8	1.74 321 13.6 12.8	1.86 400 13.6 12.8	2.05 330 13.6 12.8	2.17 332 13.6 12.8	2.2 420 13.6 12.8	2.27 421 13.6 12.8	2.36 431 13.6 12.8
	0.20	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.12 100 5.6	2.22 200 5.6	3.32 300 5.6								
	0.25	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.16 100 5.6	2.24 200 5.6	3.33 300 5.6								
	0.50	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.14 100 5.5	2.27 200 5.5	3.33 300 5.5								
8	0.12	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.12 210 13.4 12.8	1.16 211 13.4 12.8	1.20 211 13.4 12.8	1.33 220 13.4 12.8	1.76 321 13.4 12.8	1.88 400 13.4 12.8	2.18 330 13.4 12.8	2.20 420 13.4 12.8	2.30 421 13.4 12.8	2.4 431 13.4 12.8	
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.17 210 12.7	1.22 211 12.7	2.22 420 12.7								
	0.20	$q$ (hkl) $a_{Pm3n}$	1.10 210 12.6	1.21 211 12.6	2.22 420 12.6								
	0.25	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.12 100 5.6	2.22 200 5.6	3.32 300 5.6								
	0.50	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.14 100 5.5	2.27 200 5.5	3.39 300 5.5								

$q$  in  $nm^{-1}$ ;  $a$  in nm

**Tabla A4.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de la estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)C_2H_4/$ MOG-siRNA, en presencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

$\rho_{eff}$	$\alpha$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	0.12	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.15 100 5.4	2.29 200	3.43 300								
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.17 211 13.1 13.8	1.21 211	1.34 220	2.07 330	2.38 422						
	0.20	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.18 211 13.1 13.6	1.34 220	2.04 330	2.36 422	3.19 622						
	0.25	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.08 100 5.8	2.16 200	3.24 300								
	0.50	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.14 100 5.5	2.28 200	3.43 300								
8	0.12	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.08 211 13.8 13.3	1.2 211	1.3 220	1.58 321	2.08 330	2.04 422					
	0.15	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.19 211 13.1 12.2	1.34 211	2.07 330	2.39 422	3.16 531						
	0.20	$q$ (hkl) $a_{Ia3d}$ $a_{Pm3n}$	1.12 211 13.3 13.2	1.18 211	1.29 220	1.72 321	1.83 400	2.044 330	2.151 420	2.25 421	2.35 422	2.51 521	2.83 611
	0.25	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.11 100 5.6	2.20 200	3.29 300								
	0.50	$q$ (hkl) $a_{L_\alpha}$	1.12 100 5.6	2.24 200	3.4 300								

$q$  in  $nm^{-1}$ ;  $a$  in nm

**Tabla A5.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de las estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_2C_2H_4/$ MOG-siRNA, en presencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

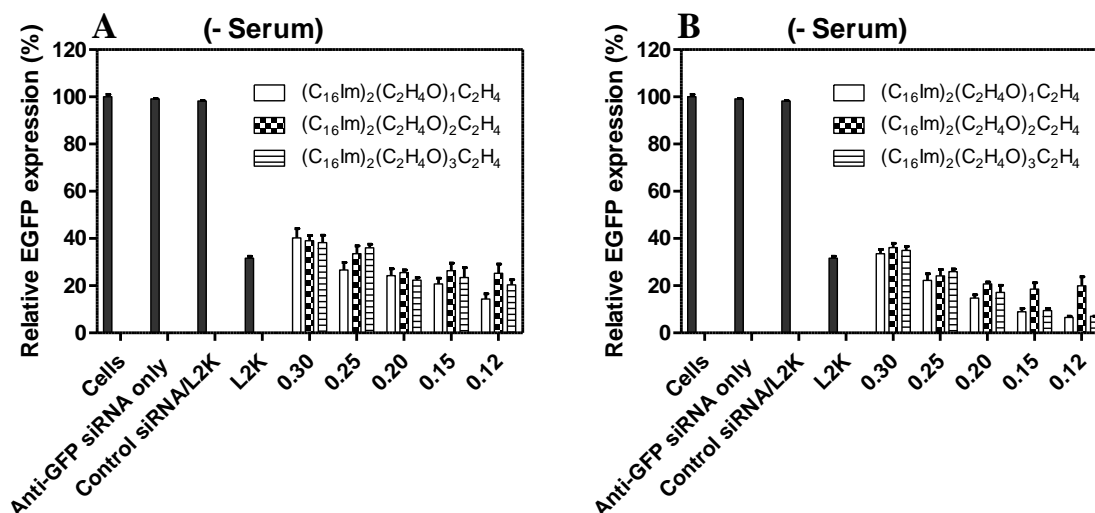
$\rho_{eff}$	$\alpha$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	0.12	$q$	1.13	1.16	1.21	1.34	1.77	1.89	2.11	2.22	2.25	2.31	2.41
		(hkl)	210	211	211	220	321	400	330	332	420	421	422
		$a_{Ia3d}$	13.3										
		$a_{Pm3n}$	12.6										
	0.15	$q$	1.12	1.15	1.20	1.33	2.08	2.24	2.40				
8	0.12	(hkl)	210	211	211	220	330	420	422				
		$a_{Ia3d}$	13.4										
		$a_{Pm3n}$	12.6										
		$q$	1.13	1.14	1.91	2.25	2.27						
	0.20	(hkl)	100	211	400	332	200						
8	0.12	$a_{Ia3d}$	12.6										
		$a_{Pm3n}$	5.6										
		$q$	1.12	2.24									
		(hkl)	100	200									
	0.25	$a_{L_\alpha}$	5.6										
8	0.12	$q$	1.15	2.29									
		(hkl)	100	200									
		$a_{L_\alpha}$	5.4										
		$q$	1.13	2.22	3.35								
	0.15	(hkl)	100	200	300								
8	0.12	$a_{L_\alpha}$	5.6										
		$q$	1.12	1.21	2.08	2.24	2.40						
		(hkl)	210	211	330	420	421						
		$a_{Pm3n}$	12.1										
	0.20	$q$	1.14	2.26	3.4								
8	0.12	(hkl)	100	200	300								
		$a_{L_\alpha}$	5.5										
		$q$	1.12	2.24									
		(hkl)	100	200									
	0.25	$a_{L_\alpha}$	5.5										
8	0.12	$q$	1.17	2.32	3.45								
		(hkl)	100	200	300								
		$a_{L_\alpha}$	5.4										
		$q$	1.12	2.24									
	0.50	(hkl)	100	200									

$q$  in  $nm^{-1}$ ;  $a$  in  $nm$

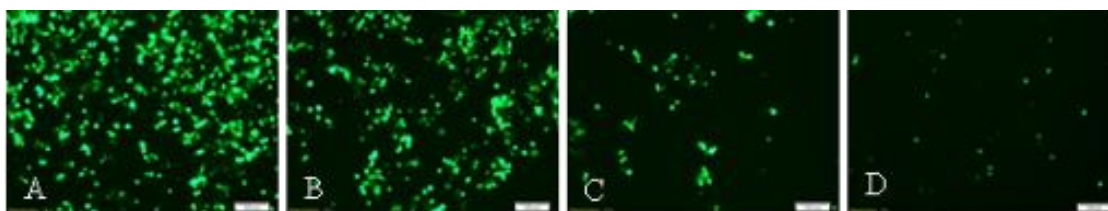
**Tabla A6.** Valores de  $q_{100}$ , (hkl) y el parámetro  $a$  de la estructuras encontradas cúbica ( $Ia3d$  en negro y  $Pm3n$  en azul) y lamellar ( $L_\alpha$  en rojo) para el sistema  $C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_3C_2H_4/$ MOG-siRNA, en presencia de Pluronic F127, a varias composiciones de GCL ( $\alpha$ ) de los lípidos mixtos, y a varios ratios de carga efectiva ( $\rho_{eff}$ ).

$\rho_{eff}$	$\alpha$	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4	0.12	$q$	1.17	1.21	1.34	1.77	1.89	2.12	2.22	2.31	2.41		
		(hkl)	211	211	220	321	400	330	420	332	422		
		$a_{Ia3d}$	12.6										
		$a_{Pm3n}$	12.7										
	0.15	$q$	1.09	1.15	1.21	1.32	1.75	1.86	2.087	2.183	2.28	2.4	2.87
		(hkl)	210	211	211	220	321	400	330	420	422	431	530
		$a_{Ia3d}$	13.3										
		$a_{Pm3n}$	13.1										
8	0.20	$q$	1.12	2.21	3.30								
		(hkl)	100	200	300								
		$a_{L_\alpha}$	5.6										
		$q$	1.09	2.18									
		(hkl)	100	200									
8	0.25	$q$	1.18	2.35	3.51								
		(hkl)	100	200	300								
		$a_{L_\alpha}$	5.3										
		$q$	1.15	1.20	1.33	1.77	1.88	2.08	2.10	2.20	2.29	2.4	
		(hkl)	211	211	220	321	400	420	330	420	422	431	
8	0.50	$a_{Ia3d}$	13.5										
		$a_{Pm3n}$	13.5										
		$q$	1.09	1.21	2.08	2.20	2.4						
		(hkl)	210	211	300	420	422						
		$a_{Pm3n}$	12.9										
8	0.20	$q$	1.12	2.21	3.30								
		(hkl)	100	200	300								
		$a_{L_\alpha}$	5.6										
		$q$	1.11	2.21	3.31								
		(hkl)	100	200	300								
8	0.25	$a_{L_\alpha}$	5.6										
		$q$	1.15	1.20	1.33	1.77	1.88	2.08	2.10	2.20	2.29	2.4	
		(hkl)	211	211	220	321	400	420	330	420	422	431	
		$a_{Ia3d}$	13.5										
		$a_{Pm3n}$	13.5										

$q$  in  $nm^{-1}$ ;  $a$  in nm



**Figura A5.** El análisis de citometría de flujo del silenciamiento en siRNA anti-GFP (50 nM) expresado en células HEK293T en ausencia de suero mediante liposomas (A; sin Pluronic F127, y B; con Pluronic F127) de los tres GCLs  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ ;  $n = 1, 2$  o  $3$  a varias fracciones molares ( $\alpha = 0.30, 0.25, 0.20, 0.15$  y  $0.12$ ) y ratio de carga efectiva  $\rho_{eff} = 6$ . Las células transfectadas unicamente con siRNA anti-GFP y los lipoplejos de siRNA-L2K se han usado como control en los experimentos.



**Figura A6.** Selección de imágenes de microscopía de fluorescencia de la expresión de EGFP en la línea celular HEK 293T (A) y transfectadas con siRNA anti-GFP (50 nM) en presencia de suero (10%FBS) con los liposomas  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_1 C_2H_4$  con MOG a  $\alpha = 0.12$  y ratio de carga efectiva  $\rho_{eff} = 8$ , (D). Las células transfectadas solo con siRNA anti-GFP, (B), y los lipoplejos siRNA L2K anti-GFP, (C), ha servido de control en el experimento.





## ANEXO 2

## ANEXO 2

---

En este anexo se indexan los artículos derivados de esta tesis y los directamente relacionados

### Artículos derivados

1. Efficient Cellular Knockdown Mediated by siRNA Nanovectors of Gemini Cationic Lipids Having Delocalizable Headgroups and Oligo-Oxyethylene Spacers. Martínez-Negro, M.; Kumar, K.; Barran-Berdon, A.L.; Datta, S.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8, 22113. (FI:7,145)
2. Biophysics and protein corona analysis of Janus cyclodextrin-DNA nanocomplexes. Efficient cellular transfection on cancer cells. Martínez-Negro, M.; Caracciolo, G.; Palchetti, S.; Pozzi, D.; Capriotti, C. Cavaliere.; Laganà, A.; Ortiz Mellet, C.; Benito, J.M.; García Fernández, J.M.; Aicart, E.; Junquera, E. *BBA-General Subjects*. **2017** (FI:5,083)  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.010
3. Transfection of Plasmid DNAs by Cationic Mixed Liposomes Constituted by Either a Gemini Lipid and/or its Monomeric Counterpart. Martínez-Negro, M.; Barran-Berdon, Ana L.; Aicart, C.; Moyá, M.L.; Tros de Ilarduya, C.; Aicart, E.; Junquera, E. Enviado a *Coll. Surf. B. Biomembranes*. **2017**
4. A mixed colloidal system based on a gemini-bolaform lipid as a new efficient and cell friendly gene nanocarrier. Martínez-Negro, M.; García-Río, L.; Tros de Ilarduya, C.; Aicart, E.; Junquera, E. En preparación. **2017**

### Artículos directamente relacionados

5. Trehalose-based Janus cyclooligosaccharides: the “Click” synthesis and DNA-directed assembly into pH-sensitive transfectious nanoparticles. Jiménez Blanco, J.L.; Ortega-Caballero, F.; Blanco-Fernández, L.; Carmona, T.; Marcela, G.; Martínez-Negro, M.; Aicart, E.; Junquera, E.; Mendicuti, F.; Tros de Ilarduya, C.; Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J.M. *Chem. Commun*, **2016**, 52, 10117 (FI: 6,567)
6. Biophysical study of gene nanocarriers formed by anionic/zwitterionic mixed lipids and pillar[5]arene polycationic macrocycles. Barran-Berdon, Ana L.; Martínez-Negro, M.; García-Río, L.; Domènech, O.; Tros de Ilarduya, C.; Aicart, E.; Junquera, E. Aceptado en *Journal of Materials Chemistry B*. **2017 Hot paper**. DOI: 10.1039/C6TB02939F (FI:4,872)





# Efficient Cellular Knockdown Mediated by siRNA Nanovectors of Gemini Cationic Lipids Having Delocalizable Headgroups and Oligo-Oxyethylene Spacers

María Martínez-Negro,<sup>†,‡</sup> Krishan Kumar,<sup>‡,§</sup> Ana L. Barrán-Berdón,<sup>†,‡</sup> Sougata Datta,<sup>‡</sup> Paturu Kondaiah,<sup>||</sup> Elena Junquera,<sup>†</sup> Santanu Bhattacharya,<sup>\*,‡,§</sup> and Emilio Aicart<sup>\*,†</sup>

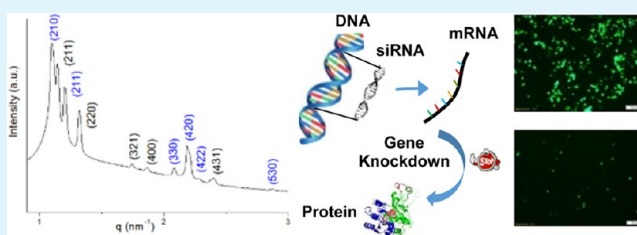
<sup>†</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>‡</sup>Departments of Organic Chemistry, and <sup>§</sup>Director's Research Unit, Indian Association for the Cultivation of Science and <sup>||</sup>Molecular Reproduction Development and Genetics, Indian Institute of Science, 560012 Bangalore, India

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The use of small interfering RNAs (siRNAs) to silence specific genes is one of the most promising approaches in gene therapy, but it requires efficient nanovectors for successful cellular delivery. Recently, we reported liposomal gene carriers derived from a gemini cationic lipid (GCL) of the 1,2-bis(hexadecyl dimethyl imidazolium) oligo-oxyethylene series  $((C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4)$  with  $n = 1, 2$ , or  $3$  and 1,2-dioleoyl phosphatidylethanolamine as highly efficient cytotfectins for pDNA. On the basis of the satisfactory outcomes of the previous study, the present work focuses on the utility of coliposomes of these gemini lipids with the biocompatible neutral lipid mono oleoyl glycerol (MOG) as highly potent vectors for siRNA cellular transport in the presence of serum. The  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA lipoplexes were characterized through (i) a physicochemical study (zeta potential, cryo-transmission electron microscopy, small-angle X-ray scattering, and fluorescence anisotropy) to establish the relationship between size, structure, fluidity, and the interaction between siRNA and the GCL/MOG gene vectors and (ii) a biological analysis (flow cytometry, fluorescence microscopy, and cell viability) to report the anti-GFP siRNA transfections in HEK 293T, HeLa, and H1299 cancer cell lines. The in vitro biological analysis confirms the cellular uptake and indicates that a short spacer, a very low molar fraction of GCL in the mixed lipid, and a moderate effective charge ratio of the lipoplex yielded maximum silencing efficacy. At these experimental conditions, the siRNA used in this work is compacted by the GCL/MOG nanovectors by forming two cubic structures ( $Ia3d$  and  $Pm3n$ ) that are correlated with excellent silencing activity. These liposomal nanocarriers possess high silencing activity with a negligible cytotoxicity, which strongly supports their practical use for in vivo knockdown studies.

**KEYWORDS:** biophysics, cytotoxicity, gemini cationic lipids, gene silencing, lipoplexes, short interfering RNA, structure–activity relationship (SAR)



## INTRODUCTION

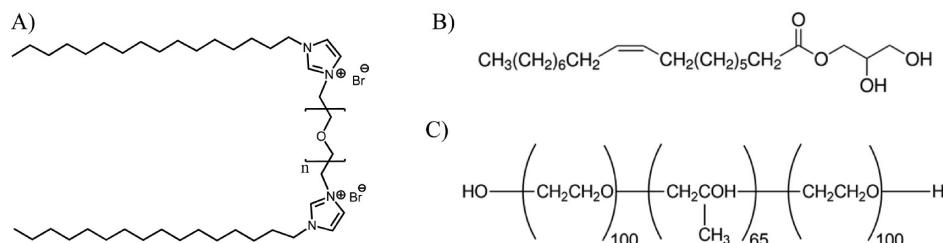
Because of the available information on the human genomic sequence, gene therapy has become an emerging area in nanomedicine for delivering nucleic acids into the cells.<sup>1–4</sup> In early days, this field was limited to the use of plasmid DNA (pDNA).<sup>5–11</sup> However, the discovery of RNA interference (RNAi) has prompted a remarkable progress in the search of new therapeutic nucleic acids.<sup>12–17</sup> Unlike DNA, which must reach the nucleus to perform a predesigned activity, the RNAi includes the use of double-stranded RNA (dsRNA) or short interfering RNA (siRNA) to induce efficacious post-transcriptional silencing of the gene of interest with high specificity.<sup>18</sup> This in turn results in a knockdown expression of a selected specific pathogenic protein.<sup>19</sup> Nevertheless, the siRNA molecules cannot easily cross the cell membrane and are prone to easy degradation by the serum nucleases.<sup>20</sup>

Furthermore, as pDNA, the negative charge of RNA limits its transport through the cell membrane (also negative), and thus, the fruition of broad potential of RNAi-based therapeutics lies in achieving efficacious delivery of siRNA molecules by means of safer delivery vehicles.<sup>21</sup> The viral vectors were chosen initially, but, as they often cause an adverse immune response in the organism, research groups have focused their work on nonviral carriers, such as liposomes, polymers, and nanoparticles. Among them, cationic lipid-based delivery tool, that is, cationic liposomes, have been part of extensive scientific research for the cellular transport of nucleic acids.<sup>17</sup> The liposomes of gemini cationic lipids (GCLs), as nonviral gene

Received: July 18, 2016

Accepted: August 10, 2016

Published: August 10, 2016

Scheme 1. Scheme of the Two Lipids<sup>a</sup>

<sup>a</sup>(A) Cationic lipids of the series  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  with  $n = 1, 2$ , or  $3$ ; (B) MOG neutral lipid; (C) Pluronic F127.

vectors, have received significant attention in the field of gene delivery,<sup>22,23</sup> and of those that provided promising results in the pDNA delivery,<sup>6,7,9,11,24–27</sup> the molecular structures of the GCLs, constituted by two cationic groups linked by a spacer, offer a huge variety of potential modifications that can be used to improve the biological activity with low cytotoxicity, as our group reported recently.<sup>17,26–30</sup> In these cases, the gene vector is a mixture of a cationic lipid, which yields the positive charge necessary to interact with both the negatively charged nucleic acid and the cell membrane, and a helper lipid, which works as coadjuvant in transfection. The helper lipid usually employed in pDNA gene transfections belongs to the phosphatidylcholine (as DOPC) or phosphatidylethanolamine (as DOPE) families. Recently, mono oleoyl glycerol (MOG), a natural and neutral lipid, has shown promise as a coadjuvant in lipid formulations for gene silencing studies using siRNA. It is known that the helper lipid induces the formation of different lyotropic liquid crystalline phases. Thus, in lipoplexes with pDNA, DOPC induces  $L_\alpha$  lamellar phases,<sup>10,31</sup> while DOPE induces the formation of  $H_{II}^C$  inverse micellar hexagonal phases that generally favor transfection.<sup>6,29,30,32,33</sup> However, in lipoplexes with short interfering siRNA, MOG is also used as helper lipid because of its unique ability to form gyroid cubic structures that favor membrane fusion mediated by the onset of pore formation, which results in a major knockdown efficacy.<sup>17,34–37</sup>

These cubic structures can be favored also by modifying other structural factors such as the size of the genetic material introduced, since small interfering RNAs (of 19–25 bp) are shorter than pDNAs (~4700 bp), and hence probably, the use of siRNA favors the formation of cubic phases.<sup>34</sup>

Despite various scientific advancements in the liposomal gene therapy, there is still a necessity to develop formulations that could be beneficial at practical platform.<sup>38,39</sup> The use of GCLs for siRNA delivery is a relatively less-explored phenomenon in current research of liposomal gene delivery. Following these guidelines, we used gene vectors consisting on a GCL of the series 1,2-bis(hexadecyldimethyl imidazolium) oligo-oxyethylene series  $((C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$  with  $n = 1, 2$ , or  $3$ )<sup>27</sup> and MOG as a neutral helper lipid, which could substantially downregulate the EGFP expression in EGFP expressing cell lines without manifestation of any marked toxicity. Therefore, this shows a potential in the siRNA-mediated practical gene-silencing applications. Accordingly, the studies reported in this work are focused on the physicochemical and biological characterization of the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA lipoplexes as gene-silencing vectors. The physicochemical characterization was performed using techniques like zeta potential, cryo-transmission electron microscopy (TEM), small-angle X-ray scattering (SAXS), and fluorescence anisotropy, to establish

the relationship between size, structure, fluidity, and the interaction between siRNA and the gene vector formed by GCL/MOG mixed lipids. The biological studies, aimed to evaluate the GFP knockdown efficiency of the three siRNA vectors proposed in this work, were performed using flow cytometry and fluorescence microscopy in HEK 293T, HeLa, and H1299 cancer cell lines. The effect of siRNA lipoplexes on cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. These GCL/MOG gene vectors provided a better vector–siRNA interaction and a substantial siRNA cellular transport even in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS). Taken together these results indicate that the effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ), the length of the GCL spacer, and mainly, the molar fraction of the GCL in the mixed lipid formulation play a key role in the silencing efficacy. In fact, the in vitro biological studies using the three  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA lipoplexes show significant gene knockdown levels, the maximum decrease being found for the shorter spacer ( $n = 1$ ), at  $\rho_{eff} = 6$  and 8, and molar ratios ( $\alpha$ ) of the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG mixed lipid as low as 0.12 and 0.15. The analysis of the entire findings allows us to establish an interesting structure–biological activity relationship (SAR) that explains how siRNA molecules are compacted by the GCL/MOG nanoaggregates and help improve the siRNA-mediated silencing in the cellular cytoplasm. Overall, we present liposomal nanovectors that yield high silencing levels, with negligible cytotoxicity profile, as observed at in vitro level, and report them as quite promising vectors to be used for in vivo knockdown studies.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** The gemini cationic lipids of the 1,2-bis-(hexadecyldimethyl imidazolium) oligo-oxyethylene series, abbreviated as  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ , with different spacer length  $n = 1, 2$ , or  $3$  (Scheme 1A), were synthesized by our group according to the procedure reported in a previous work.<sup>27</sup> MOG, supplied by Sigma-Aldrich, was used as neutral helper lipid (Scheme 1B). Pluronic F127 (10% solution in water) was supplied by Invitrogen. Cell culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) and FBS were supplied from Sigma and Gibco, respectively. Anti-GFP siRNA and non-targeting control siRNA were obtained from Dharmacon and Eurogentec, respectively.

**Preparation of Lipoplexes.** Lipid films were prepared by mixing different amounts of the GCL and MOG to obtain the desired GCL molar fraction ( $\alpha$ ). The mixed liposomes were dissolved in chloroform that was removed by evaporation under high vacuum. Afterward, dried lipid films were hydrated with 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid (HEPES) buffer at physiological pH (=7.4) and homogenized with alternating cycles of vortexing and sonication. To obtain unilamellar mixed liposomes of ~100 nm diameter, the samples were extruded according to a procedure previously described.<sup>28,30</sup> Subsequently, Pluronic F127 (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  to obtain a final concentration of 10% in mass of GCL) was added to the hydrated

film containing each prepared mixed lipid composition to provide colloidal stability to liposomes. Finally, siRNA and  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG were mixed at 1:1 v/v to obtain the desired lipoplex effective charge ratio ( $\rho_{\text{eff}}$ ).<sup>28,30</sup>

To fit the optimum conditions for each experimental technique, the concentration of siRNA in HEPES solution was prepared as follows: 0.05 mg/mL for  $\zeta$ -potential and fluorescence anisotropy, 1 mg/mL for cryo-TEM, 200  $\mu\text{g}/\text{capillary}$  ( $\sim 5$  mg/mL) for SAXS, and 50 nM for transfection studies.

**Characterization of Lipoplexes.** Electrophoretic mobility, measured with a phase analysis light scattering technique (Zeta PALS, Brookhaven Instrument Corp, USA),<sup>29,30</sup> was used to determine the  $\zeta$ -potential values. Each electrophoretic mobility datum was measured as an average over 50 independent measurements. The  $\zeta$ -potential of lipoplexes was determined at several GCL molar fractions ( $\alpha$ ) in the mixed lipid and at different ( $m_{\text{GV}}/m_{\text{RNA}}$ ) mass ratios between the gene vector ( $m_{\text{GV}}$ ) and the RNA ( $m_{\text{RNA}}$ ) for the three studied lipoplex systems.

SAXS experiments were implemented on the NCD 11 Beamline at ALBA Synchrotron (Barcelona, Spain). The energy of the incident beam was 12.6 keV ( $\lambda = 0.995$  Å). Samples were placed in glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. SAXS experiments were run at different GCL molar fractions ( $\alpha$ ) of the mixed lipid and at several effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ) of the lipoplexes.

Cryo-TEM experiments were prepared following a general procedure described in previous works.<sup>40,41</sup> In these experiments, perforated Quantifoil R1.2/1.3 (hole diameter 1.2  $\mu\text{m}$ ) on a 400-mesh copper grid were used. Images were obtained using a Jeol JEM 2011 cryo-electron microscope operated at 200 kV, under low-dose conditions, and using different degrees of defocus (500–700 nm) to obtain an adequate phase contrast.<sup>42</sup> Images were recorded on a Gatan 794 Multiscan digital camera. Finally, the CCD images were processed and analyzed with Digital Micrograph.

Fluorescence anisotropy of 1,6-diphenylhexatriene (DPH) probe was measured with a PerkinElmer LS-50B luminiscence spectrometer following a protocol explained elsewhere.<sup>43</sup> Anisotropy values  $r_{430}$  ( $= (I_{\text{VV}} - GI_{\text{VH}})/(I_{\text{VV}} + 2GI_{\text{VH}})$ ) were determined by measuring the intensities of the light emitted by DPH probe, with the excitation and the emission polarized following the modes: vertical–vertical ( $I_{\text{VV}}$ ), vertical–horizontal ( $I_{\text{VH}}$ ), horizontal–horizontal ( $I_{\text{HH}}$ ), and horizontal–vertical ( $I_{\text{HV}}$ ). The instrument grating factor,  $G$  ( $= I_{\text{HV}}/I_{\text{HH}}$ ), estimated as an average of 10 measurements for each solution, allows to correct optical and electronic differences in the parallel and perpendicular channels. The influence of the light scattering of samples in anisotropy values was also evaluated and considered with the corresponding blank solutions. DPH probe was excited at 360 nm, and its fluorescence emission was recorded at 430 nm. A slit width of 2.5 nm for both the excitation and the emission was selected. Each anisotropy value is an average over 36 experimental independent measurements.

Flow cytometry was used to suss out the EGFP knockdown phenomenon in EGFP expressing HEK 293T (human embryonic kidney), HeLa (cervical carcinoma), and H1299 (human lung cancer) cell lines, by means of various anti-GFP siRNA (Dharmacon) transfection, mediated by different lipid formulations.<sup>44</sup> In a typical experiment, the cells were first seeded in 24-well cell culture plates at a density of 60 000 cells/well 24 h before the transfection initiation. The lipoplexes of anti-GFP siRNA (50 nM) were prepared using various lipid compositions at different effective charge ratios. These siRNA lipoplexes were added to cells in absence and in the presence of serum (10% FBS) containing media for a period of 4 h. The EGFP expression was analyzed 48 h post transfection under FACS Calibur flow cytometer (Becton-Dickinson). The flow cytometry data was analyzed using WinMDI 2.9 software. The EGFP downregulation was analyzed based on the percentage of EGFP expression (mean fluorescence intensity) relative to untreated cells.

The EGFP expression levels were visually analyzed using a fluorescence microscope (Olympus IX-81).

The intracellular fluorescence of Cy-3 labeled siRNA was assessed by means of flow cytometry (as discussed above) and confocal microscopy after 4 h of incubation with cells in the presence of serum following actual transfection conditions. For confocal microscopic analysis, the cells were seeded on coverslips and allowed to grow for 24 h. The cells were transfected, fixed with 4% *p*-formaldehyde solution, and analyzed under confocal laser scanning microscope (LSM meta, Zeiss). For the experiments involving the trafficking of lipoplexes, after 2 h of transfection, the cells were incubated with LysoTracker green (50 nM) and subjected to confocal microscopic analysis. To understand the cellular uptake mechanism, the cells were pretreated with chlorpromazine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), genistein (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *m*- $\beta$ -CD (10 mg/mL), and wortmannin (100 nM) for 1 h, and the internalization of lipoplexes prepared from Cy-3 labeled siRNA was assessed under flow cytometry.

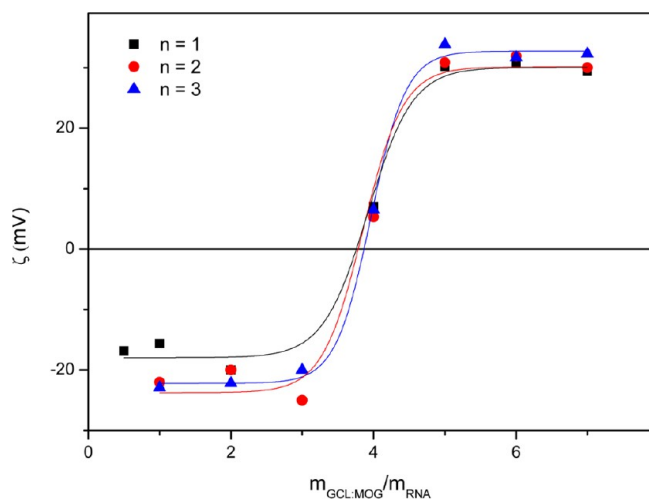
The cell viability of cells treated with various GCL/MOG-based siRNA-lipoplexes was investigated using a 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) based colorimetric assay. After the completion of transfection procedure in 96-well plates (10 000 cells/well) as discussed above, the MTT reagent (20  $\mu\text{L}$ ; 5 mg/mL) was added and incubated with cells for 4 h. At the end, entire media were removed from the wells, and dimethyl sulfoxide (200  $\mu\text{L}$ ) was added to each well. The absorbance for each sample was measured in a microplate reader at 570 nm. The cell viability was calculated based on at least three replicates of three independent experiments.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Biophysical Characterization of the Lipoplexes in the Absence of Cells.** In a recent work,<sup>27</sup> we demonstrated the high transfection efficacy of the series  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ DOPE, with  $n = 1, 2$ , or 3, as lipidic vectors for plasmid DNA cellular delivery. On the basis of these outcomes, in the present work, we report the same GCL series but substituting the helper lipid DOPE by MOG and focusing the study on the characterization and the gene knockdown (siRNA transfection) capability of  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA lipoplexes. The electroneutrality in the lipoplexes is the most important factor in their preparation, and, for this reason, it needs to be determined initially. This is because the lipoplexes must have a net positive charge ( $\rho_{\text{eff}} > 1$ ) to be capable of interacting with the negatively charged cellular membranes and crossing them. This in turn makes them potentially efficient agents for transfecting nucleic acids. On the one hand, it has been demonstrated that many multivalent cationic gene vectors (as the GCLs of the present work) have an effective charge lower than its nominal one, and thus, the knowledge of its real value is determinant.<sup>26–28,31,45–47</sup> On the other hand, literature results confirm that linear DNA (with thousands of base pairs, as DNA from sources such as calf thymus, salmon sperm, etc) and short RNAs (with 19–25 bp) have an effective negative charge ( $q_{\text{eff RNA}}^-$ ) that match with their nominal values ( $-2/\text{bp}$ ). On the basis of this, the effective charge of the GCLs of the series  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ , with  $n = 1, 2$ , and 3, was recently determined by us<sup>27</sup> from the  $\zeta$ -potential measurements of the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ DOPE-ctDNA lipoplexes at different molar fractions ( $\alpha = (m_{\text{GCL}}/M_{\text{GCL}})/(m_{\text{GCL}}/M_{\text{GCL}} + m_{\text{MOG}}/M_{\text{MOG}})$ ) of the GCLs in the mixed lipid, following a procedure that has been described earlier.<sup>28</sup> In this expression,  $m_{\text{GCL}}$  and  $m_{\text{MOG}}$  are the masses of GCL and MOG, weighted at certain molar fraction ( $\alpha$ ), while  $M_{\text{GCL}}$  and  $M_{\text{MOG}}$  are the molar masses of GCL and MOG. On average, the effective charge  $q_{\text{eff GCL}}^+$  for the three GCLs of the series used in this work, and at the whole molar fraction ( $\alpha$ ) range, has a value of  $q_{\text{eff GCL}}^+ = (+1.8 \pm 0.1)$ , that is, 10% lower than their nominal ones (+2). In any case, the effective charge



of these GCLs has been confirmed to remain constant for the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$ -siRNA lipoplexes of the present work by means of the corresponding  $\zeta$ -potential study and using the same procedure.<sup>28</sup> Figure 1 shows the  $\zeta$ -

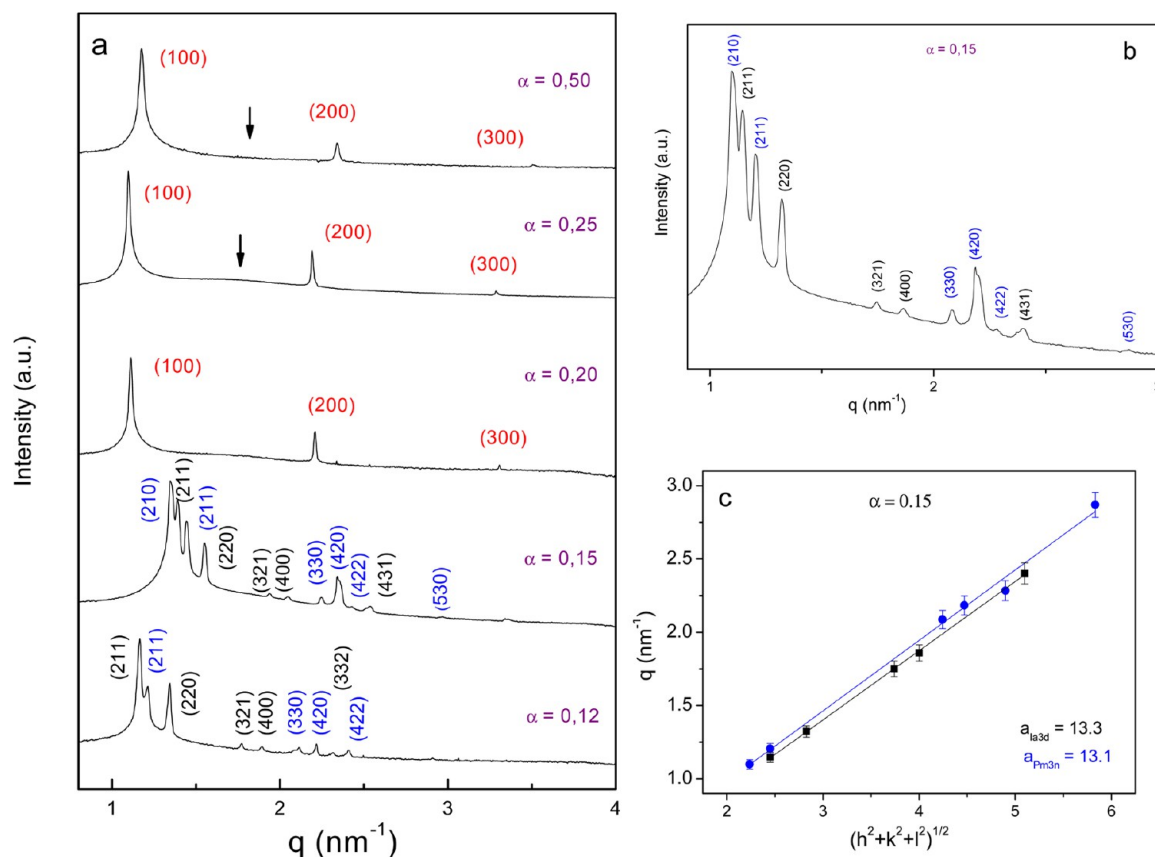


**Figure 1.** Plots of  $\zeta$ -potential vs nanoaggregate masses ratio ( $m_{GCL/MOG}/m_{RNA}$ ), at molar fraction  $\alpha = 0.2$  of the mixed lipid, for the lipoplexes of the series  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$ -siRNA, in the presence of Pluronic F127. Black,  $n = 1$ ; red,  $n = 2$ ; and blue,  $n = 3$ . Errors are within  $\pm 5\%$ .

potential values versus vector/RNA mass ratios ( $m_{GCL/MOG}/m_{RNA}$ ) at molar fraction  $\alpha = 0.2$ . Typical sigmoidal profiles, showing a characteristic inversion of sign at the electro-neutrality ratio ( $m_{GCL/MOG}/m_{RNA}$ )<sub>φ</sub> (where  $\rho_{eff} = 1$ ) and very similar for the three lipoplexes, allow us to obtain an average  $q_{eff}^{+} GCL = (+1.8 \pm 0.1)$ , in full agreement to the ones determined recently.<sup>27</sup> As fully described earlier for other lipoplexes and polyplexes,<sup>17,27,29,47</sup> each electroneutrality value ( $m_{GCL/MOG}/m_{RNA}$ )<sub>φ</sub> corresponds to the minimum amount of the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/MOG$  mixed lipid needed to compact siRNA that allows the nanovector to be used as transfecting vector. Once the effective charge of the GCL is known, the effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ) of the lipoplex, between the GCL positive charges and the siRNA negative ones, may be easily calculated using

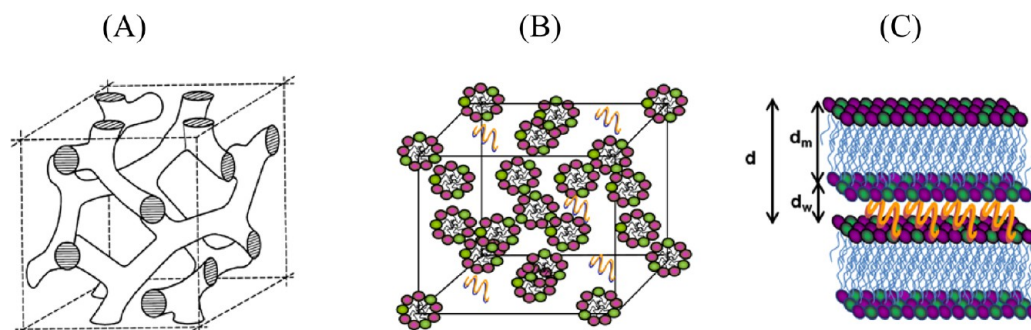
$$\rho_{eff} = \frac{n^{+}}{n^{-}} = \frac{q_{eff}^{+} GCL (m_{GCL}/M_{GCL})}{q_{eff}^{-} RNA (m_{RNA}/M_{RNA})} \quad (1)$$

In this equation,  $n^{+}$  and  $n^{-}$  are the number of moles of positive GCL and negative siRNA charges;  $q_{eff}^{+} GCL (= +1.8)$  and  $q_{eff}^{-} RNA (= -2/bp)$  are the effective charges of GCL and siRNA, and  $M_{RNA}$  is the mass of siRNA per base pair. The quantity  $\rho_{eff}$  is the key to prepare lipoplexes for optimal performance in transfection, and, for this reason, it is strongly recommended to work with effective charges of all the components in the lipoplexes.



**Figure 2.** (a) SAXS diffractograms of  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_3 C_2H_4/MOG$ -siRNA lipoplex in the presence of Pluronic F127, at various GCL compositions ( $\alpha$ ) and effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ) = 4. Miller indices ( $hkl$ ) correspond to the structures: black,  $Ia3d$ ; blue,  $Pm3n$ ; and red,  $L_{\alpha}$ . Arrows indicate the siRNA-siRNA correlation peak in the  $L_{\alpha}$  structure. (b) Expanded view of the diffractogram for  $\alpha = 0.15$ . (c) Plots of the  $q$  factor vs  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  for the cubic phases  $Ia3d$  (black square) and  $Pm3n$  (blue circle) for  $\alpha = 0.15$ . From the slopes ( $= 2\pi/a$ ), the dimension ( $a$ ) of the cell unit determined for each cubic phase was reported inside.



Scheme 2. Schemes for the Structures Found in the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA Lipoplexes<sup>a</sup> with  $n = 1, 2$ , or 3

<sup>a</sup>(A) Bicontinuous gyroid cubic ( $Ia3d$ ). (B) Micellar cubic ( $Pm3n$ ). (C) Lamellar ( $L_\alpha$ ). The GCL is represented by two alkyl chains and two headgroups (green); the neutral lipid (MOG) by one alkyl chain and a polar headgroup (purple); and the nucleic acid (siRNA) by a short double helix (orange).

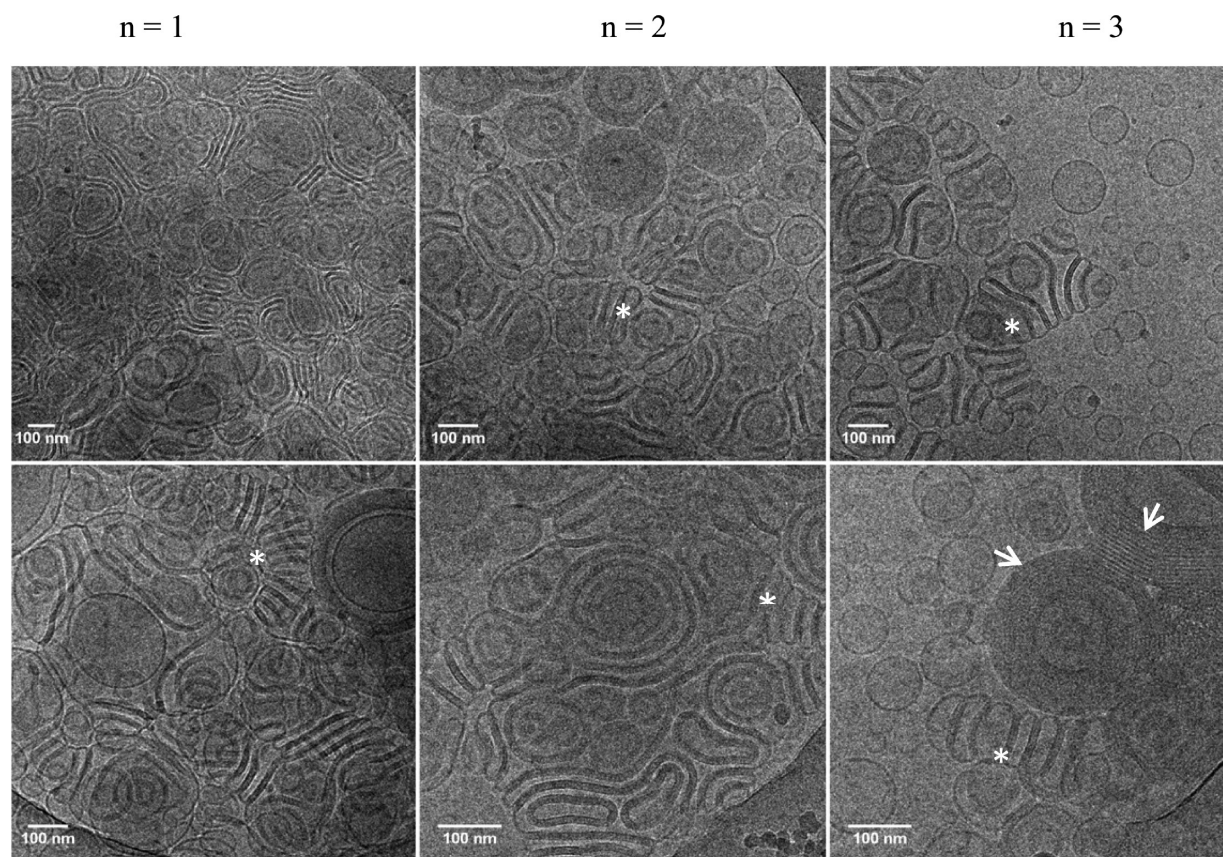
The structures of the nanovectors studied in this work were analyzed by performing SAXS experiments for  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA lipoplexes, with  $n = 1, 2$ , or 3, at several low-to-moderate GCL mole fractions ( $\alpha$ ), at various effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ), without Pluronic F127 (Figures S1 and S2), and with Pluronic F127 (Figures 2a, S3, and S4). The structural differences between without and with Pluronic conditions were not found for any of the lipoplexes reported in this work.

The correlation of the Bragg reflections in diffractograms (intensity vs  $q$  factor plots) points to three different lyotropic liquid crystal phases that coexist at certain molar fractions ( $\alpha$ ). At low  $\alpha$  values (high content on MOG), the observed peaks were assigned to the two cubic phases: one bicontinuous double gyroid cubic phase ( $Q_{II}^G$ ) and a discrete micelle cubic phase belonging to the crystallographic space groups  $Ia3d$  and  $Pm3n$ , respectively, according to the reciprocal lattice vector  $q/(2\pi/a) = (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$ , the values being  $\sqrt{6}$ ,  $\sqrt{8}$ ,  $\sqrt{14}$ ,  $\sqrt{16}$ ,  $\sqrt{20}$ ,  $\sqrt{22}$ ,  $\sqrt{24}$ ,  $\sqrt{26}$ ,  $\sqrt{30}$ , and/or  $\sqrt{32}$  for the  $Ia3d$  structure, and  $\sqrt{5}$ ,  $\sqrt{6}$ ,  $\sqrt{18}$ ,  $\sqrt{20}$ ,  $\sqrt{21}$ ,  $\sqrt{24}$ ,  $\sqrt{34}$ ,  $\sqrt{35}$ ,  $\sqrt{42}$ , and/or  $\sqrt{44}$  for the  $Pm3n$  one (see Scheme 2). It is well-known that nonionic MOG, at low water content, forms a bicontinuous double-gyroid cubic phase ( $Q_{II}^G$ ) with an  $Ia3d$  crystallographic space.<sup>48,49</sup> For each of these two cubic structures, a plot of the  $q$  factor versus  $(h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$  for the assigned Bragg reflections fits a straight line from the slope ( $= 2\pi/a$ ) of which the lattice spacing ( $a$ ) of the unit cell has been determined (Figures 2b and S1–S4). The parameters of these structures, determined for three  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA lipoplexes without (Tables S1–S3) and with (Tables S4–S6) Pluronic, are collected at several  $\alpha$  values, and at two effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 4$  and 8). The lattice spacings ( $a$ ) do not vary within the range of the studied  $\alpha$  or  $\rho_{\text{eff}}$  values for the three lipoplexes of this work, the average values being:  $\bar{a}_{Ia3d} = (13.2 \pm 0.7)$  nm for the  $Ia3d$  structure and  $\bar{a}_{Pm3n} = (12.9 \pm 0.7)$  nm for the  $Pm3n$  cubic one.

However, at moderate-to-medium  $\alpha$  values (i.e., when the GCL content increases), a third structure, compatible with a multilamellar  $L_\alpha$  lyotropic crystal phase according to Scheme 2C, appears, with characteristic Miller indices of (100) (200) (300) and so on (Figures 2a and S1–S4). The interlayer periodicity ( $d$ ), directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi/q_{100}$ ), was also determined and collected in Tables S1–S6. In all cases, values of  $d$  obtained for the  $L_\alpha$  structure of the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ MOG-siRNA lipoplexes remain independent of  $\alpha$  and  $\rho_{\text{eff}}$  resulting in an average value of  $\bar{d}_{L_\alpha} =$

$(5.6 \pm 0.1)$  nm. Notice that, similarly to that found for the  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4/$ DOPE-pDNA lipoplexes ( $n = 1, 2$ , and 3), recently studied by us,<sup>27</sup> SAXS does not evidence existence of any cubic structure but lamellar ones at moderate-to-high molar fraction ( $\alpha$ ), which reinforces the conclusion that lipoplex structure is governed by the MOG neutral helper lipid at low molar fraction ( $\alpha$ ), and by the GCL at moderate-to-high molar fraction ( $\alpha$ ), respectively.

There are different aspects in the literature regarding the morphology of the  $Ia3d$  cubic phase at a molecular level. Earlier reports<sup>34,50</sup> hypothesize that the double bicontinuous gyroid  $Q_{II}^G$  phase ( $Ia3d$ ) of CL-siRNA complexes comprise a bilayer surface separating two continuous, independent, and intertwined water nanochannels that meet in a three-way junction at  $120^\circ$  and that would allocate the siRNA molecules. However, other authors point to either direct or inverse bicontinuous micellar channels instead of the bilayer morphology.<sup>51</sup> In any case, the symmetry is cubic in the three hypothesized structures, and, accordingly, these phases are isotropic and appear black when viewed through a polarizing microscope. They are easy to detect by SAXS, but, unfortunately, from the observed scattering pattern, it is not trivial to distinguish between the three possibilities mentioned above for the inner morphology of the nanochannels, whether bilayer type, or direct micellar (hydrophobic tails pointing inward), or reverse micellar (hydrophobic tails pointing outward). The  $Ia3d$  cubic structure (Scheme 2A) has been proved to be very efficient in the siRNA silencing when the gene vector is lipid-based with a mixture of either monovalent or multivalent cationic lipid and MOG as helper lipid.<sup>34</sup> In these cases, the silencing efficacy was attributed to the membrane fusion mediated by the presence of porelike membrane structures in the unit cell of the cubic phase. This efficacy would be well-supported by any of the structures based on aqueous cationic nanochannels with siRNA adequately compacted inside, that is, the bilayer type or the inverse micellar type. The first one, additionally, offers a cationic outward surface, well-suited for crossing the negatively charged cellular membranes, but it has a drawback as to how the bilayer curvature may fit within the crystallographic cell unit dimension, a feature that is nowadays under considerable attention. On the contrary, the second one, with the hydrophobic chains outward, the channel does not appear cell-friendly. The third alternative, bicontinuous hydrophobic channels with direct micellar aggregation pattern, would satisfy the condition of offering a cationic outer surface, adequate to nicely interact with the cell membrane, but the compaction of



**Figure 3.** Cryo-TEM micrographies of  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4$ /MOG-siRNA lipoplexes in the presence of Pluronic F127, at GCL composition  $\alpha = 0.12$  and effective charge ratio  $\rho_{eff} = 4$  for  $n = 1, 2$ , and  $3$ .

the negatively charged siRNAs would have to be necessarily on the outer surface of the channels; accordingly, the level of nucleic acid compaction is obviously less than that offered by the aqueous channel-based structures. Among the three possible morphologies for the  $Ia3d$  cubic phase, it seems that most of the evidence points to the bilayer type as the more plausible scenario to explain both the structural and biological outcomes. Another important structural factor to consider is the packing parameter ( $P$ ) of the lipids comprising the nanovector: the GCLs used in this work have a  $P$  value slightly lower than 1 ( $P \leq 1$ ), while that of MOG must be slightly higher than 1. This feature would reinforce our hypothesis that among the three proposed structures, the reverse one is the less probable, and among the remaining two, the bilayer-based is the one that collects more favoring features. In fact, this is the morphology mostly described in literature for gyroid cubic  $Ia3d$  phase.<sup>34,50</sup>

The other cubic phase is found also at low  $\alpha$  values is the  $Pm3n$ . In contrast with the  $Ia3d$  phase, which is bicontinuous, the  $Pm3n$  phase is constituted by discrete micelles in cubic ordering (Scheme 2B). Again, whether the micelles are direct or reverse cannot be inferred only from the SAXS diffractograms. On the basis of the above arguments, between the two possibilities, that one based on discrete direct micelles, with the positive charge facing outward and compacting the siRNAs superficially, is more plausible to interact with the negatively charged cell membranes. The presence of this micellar structure may be supported to the feature that it is well-known that pure gemini lipids are able to form micelles in solution.<sup>52</sup> It is remarkable that this  $Pm3n$  phase is found neither for MOG

alone nor for similar systems, although it is documented that the presence of other components in the system may result in the formation of other phases that are absent in the MOG-water binary phase diagram.<sup>53,54</sup> Finally, the  $L_\alpha$  lamellar structure may be represented as alternating layers of mixed lipids and siRNA helices, where  $d (= d_m + d_w)$  in which  $d_m$  and  $d_w$  are the thickness of the mixed lipid bilayer and the siRNA aqueous monolayer, respectively (Scheme 2C). This  $d$  value, together with a value of  $d_m \approx 3.5\text{--}4.0$  nm for the GCL/MOG lipid bilayer (assumed from the molecular structures of GCLs and MOG), permit estimation of the thickness of the aqueous monolayer ( $d_w \approx 1.6\text{--}2.1$  nm), enough to allocate siRNA molecules.

From the SAXS study, several conclusions may be made: at low GCL content (low  $\alpha$ ) there is a coexistence of the bicontinuous gyroid cubic ( $Ia3d$ ) and micellar cubic phases ( $Pm3n$ ). When the GCL molar fraction increases, a phase transition from both  $Ia3d$  and  $Pm3n$  cubic phases into lamellar  $L_\alpha$  ones occurs. This fact could be explained because an increase of GCL content in the lipoplex implies a decrease of the negative curvature of the system. This negative curvature happens through the enhancement of repulsion between cationic lipids.<sup>55</sup> Furthermore, the cubic structures have the highest periodicity ( $a \approx 13$  nm), thus following the order  $d(L_\alpha) < a(Ia3d) \approx a(Pm3n)$ . This feature is significant because it has been proven that lipoplex formulations presenting cubic phases are more efficient as gene delivery vectors.<sup>34</sup>

Cryo-TEM, in combination with SAXS, was revealed as another potent experimental tool to infer the structural information. Accordingly, cryo-TEM experiments were per-



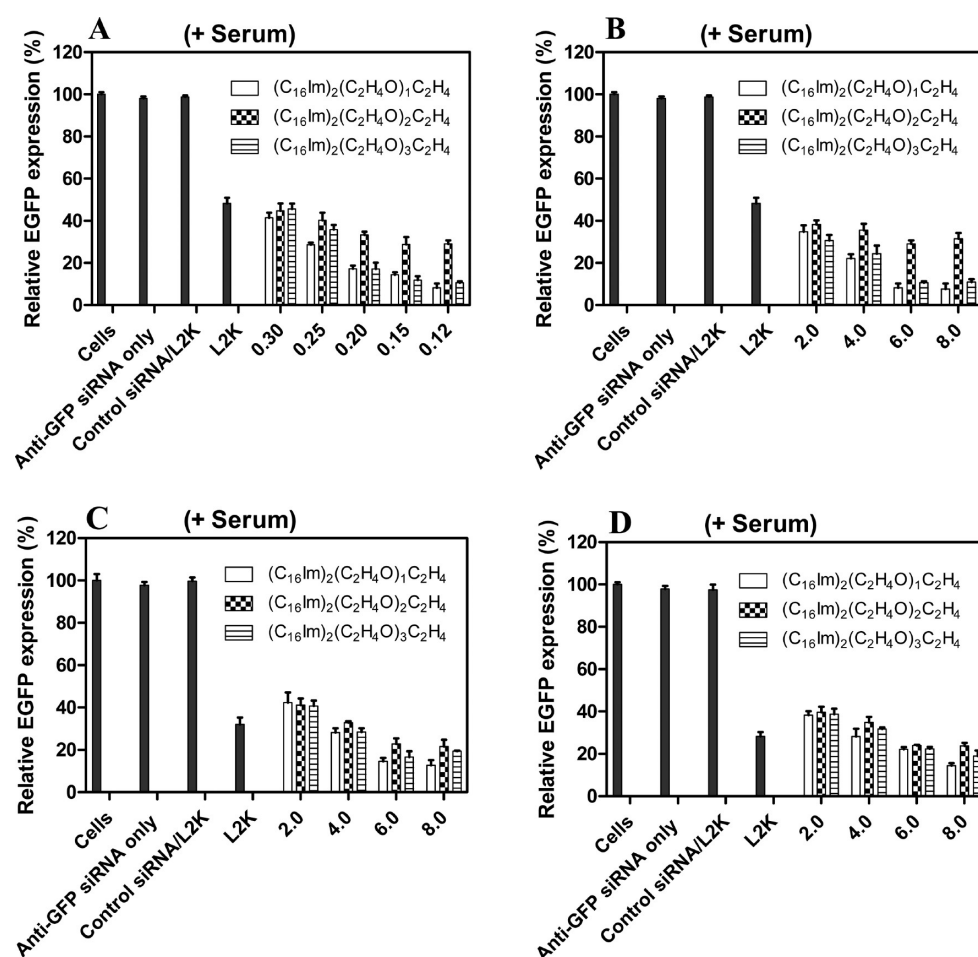
formed on  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG-siRNA}$  ( $n = 1, 2$ , and  $3$ ) lipoplexes at  $\alpha = 0.12$  and  $\rho_{\text{eff}} = 8$ , at which knockdown experiments show the maximum levels of siRNA silencing, as shown below. Figure 3 reports a selection of the obtained cryo-TEM micrographs, which reveal the major presence of elongate micellar nanoaggregates referred to as wormlike micelles, previously reported for similar systems.<sup>51</sup> The above discussion applies here as well, that is, cryo-TEM alone cannot elucidate if these wormlike micelles are direct or reverse, but the packing parameter of MOG, which is the majority component at  $\alpha = 0.12$ , together with the fact that the interaction with cells, which is quite favorable in these conditions as shown below, can only be understood if the cationic polar heads are located outward. However, these wormlike micelles are not ordered in terms of any type of cubic phases, as found for the solid samples in SAXS. In other words, the two cubic structures found in SAXS experiments have not been found in cryo-TEM micrographs at  $\alpha = 0.12$ , a feature that could be explained considering the much lower sample concentration used in cryo-TEM compared to that prepared to get the cubic structures by SAXS. It is also remarkable that as the spacer length ( $n$ ) of the GCL increases, certain contributions (low but appreciable) of multilamellar patterns, both cluster-type (CT) and fingerprint (FP), are observed (see white asterisks and white arrows, respectively). In fact, some regions of FP-type nanoaggregates are obvious for GCL/MOG-siRNA lipoplexes with  $n = 3$ . These patterns, earlier found in GCL/DOPE-pDNA lipoplexes,<sup>26,27</sup> are consistent with the  $L_\alpha$  phase observed in SAXS.

The fluidity of the lipid bilayer is also an important factor in the potential success of such systems as delivery vectors.<sup>27,28</sup> Among other properties, fluorescence anisotropy ( $r$ ) serves as a measurement of membrane fluidity. Thus, as the membrane becomes more fluidic, the degree of rotation of an excited fluorophore placed within will increase, and, accordingly, anisotropy will decrease. Bilayers of most lipoplexes reported in the literature are in the fluid state at physiological temperature, which means that their characteristic gel-to-fluid transition temperature ( $T_m$ ) is lower than the experimental temperature (either physiological or other). It is known that fluid bilayers, usually present in potentially efficient lipid-based gene vectors,<sup>27,28,45,56</sup> show very often anisotropy values below 0.2–0.25. To analyze the fluidity and the stability of the lipoplexes of this work, fluorescence anisotropy of the nonpolar fluorophore DPH was measured as a function of temperature in the presence of the  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG-siRNA}$  (with  $n = 1, 2$ , and  $3$ ) lipoplexes. Figure S5 shows fluorescence anisotropy ( $r$ ) versus  $T$  for the three lipoplexes at two selected GCL molar fractions ( $\alpha$ ) of the lipid mixtures ( $\alpha = 0.12$  and  $0.5$ ). Two different types of anisotropy versus  $T$  profiles are known in literature: (i) a clear sigmoidal profile that reveals a neat gel-to-fluid transition at  $T_m$ ; and (ii) a rather monotonous decrease, followed by a smaller and less-distinct reduction of anisotropy, from which the  $T_m$  can be determined. It is documented<sup>57,58</sup> that profile type (i) is usually found in cationic liposomes with helper lipids of the phosphatidylcholine family and their corresponding lipoplexes, while profile (ii) is typical for mixtures of cationic liposomes with DOPE or cholesterol, as helper lipids, and their lipoplexes. Thus, it is accepted that the type of helper lipid controls the anisotropy profile, whether sigmoidal or a monotonous decay. From the plots reported in Figure S5, it can be concluded that neutral MOG shows a behavior similar to the one found for helper lipids of the phosphatidylethanolamine family, inducing anisotropy profiles

of the (ii) type. Another interesting feature observed in Figure S5 is the extremely low anisotropy values ( $0.03 < r < 0.13$ ) obtained, irrespectively of the  $n$  and/or  $\alpha$  values. It means that the bilayers of the nanoaggregates studied herein are quite fluid. Moreover, it must be noted that these anisotropy values are lower than those reported previously for  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{DOPE-pDNA}$  lipoplexes (with  $n = 1, 2$ , and  $3$ ),<sup>27</sup> indicating that (i) the fluidity of the  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG}$  bilayers is higher when they interact with smaller fragments of nucleic acid, as is the case of siRNA (20 bp), compared with a pDNA of 4700 bp; (ii) the presence of MOG in the lipoplex produces a much higher decrease in the fluorescence anisotropy than DOPE, and thus, the bilayer becomes much more fluidic either at room or physiological temperature; and/or (iii) both reasons might be applicable. This effect is even more prominent with increasing content of MOG, that is, decrease in GCL molar fraction ( $\alpha$ ). In fact, anisotropy values at  $\alpha = 0.12$  are lower than those at  $\alpha = 0.5$  at all the temperatures and for the three spacers,  $n = 1, 2$ , and  $3$ . This evidence points to MOG as a potentially efficient helper and fusogenic lipid in transfection and/or knockdown studies. With regard to the effect of temperature, it may be concluded that the fluidity of the lipid bilayers increases (anisotropy decreases) with increasing temperature in all the cases, as expected. The values of  $T_m$  for  $(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4/\text{MOG-siRNA}$  lipoplexes were estimated (see Table S7). The data reported in the table indicate that the three lipoplexes show an average value of  $T_m = (24 \pm 2)^\circ\text{C}$ , with a minimal effect of either the spacer length ( $n$ ) and/or the composition of the lipids in mixtures ( $\alpha$ ). This result confirms that lipid bilayers of the lipoplexes reported herein are in the fluid state at physiological temperature ( $T \approx 37^\circ\text{C}$ ), a feature that may favor the transfection process in vivo, given that, in the solid gel-like phase, the cationic lipid membranes are not flexible enough to allow for efficient nucleic acid complexation. Thus, considering the influence of the  $T_m$  on the fluidity and stability of lipoplex membrane, the importance of the choice of the cationic and/or helper lipids based on  $T_m$  for optimal nucleic acid transfection is notable. The *cis* olefin at 9–10 position in MOG molecule, similar to the one present in the two tails of DOPE, lowers the  $T_m$  of the lipid mixture and confers upon MOG a fusogenic character similar to or even better than that of DOPE.

**Biological Activity of the Lipoplexes in the Presence of Cells.** The liposomal nanocarrier systems have always been part of extensive scientific research for cellular delivery of nucleic acids. However, the concern regarding the efficacy levels and toxicity still reinforces considerable scientific efforts to develop liposomal nanocarriers that would elicit desirable therapeutic delivery outcomes. Additionally, the tremendous potential of RNAi has appeared as an excellent tool in nucleic acid-based therapeutics. The use of siRNA molecules for successful RNAi demands their appropriate protection so as to avoid degradation after administration, cellular delivery, and consequent and efficacious cytoplasmic release. However, the successful and substantial cellular delivery of siRNA molecules lacks potential delivery systems. Thus, the development of liposome-based safe and efficacious siRNA delivery carriers would certainly upsurge the therapeutic potential of RNAi.

Thus, the GCL/MOG-based liposomal formulations  $[(\text{C}_{16}\text{Im})_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_2\text{H}_4]$  (with  $n = 1, 2$ , and  $3$ ) were subsequently used to check gene silencing activity both in absence and presence of serum (10% FBS). The gene-silencing

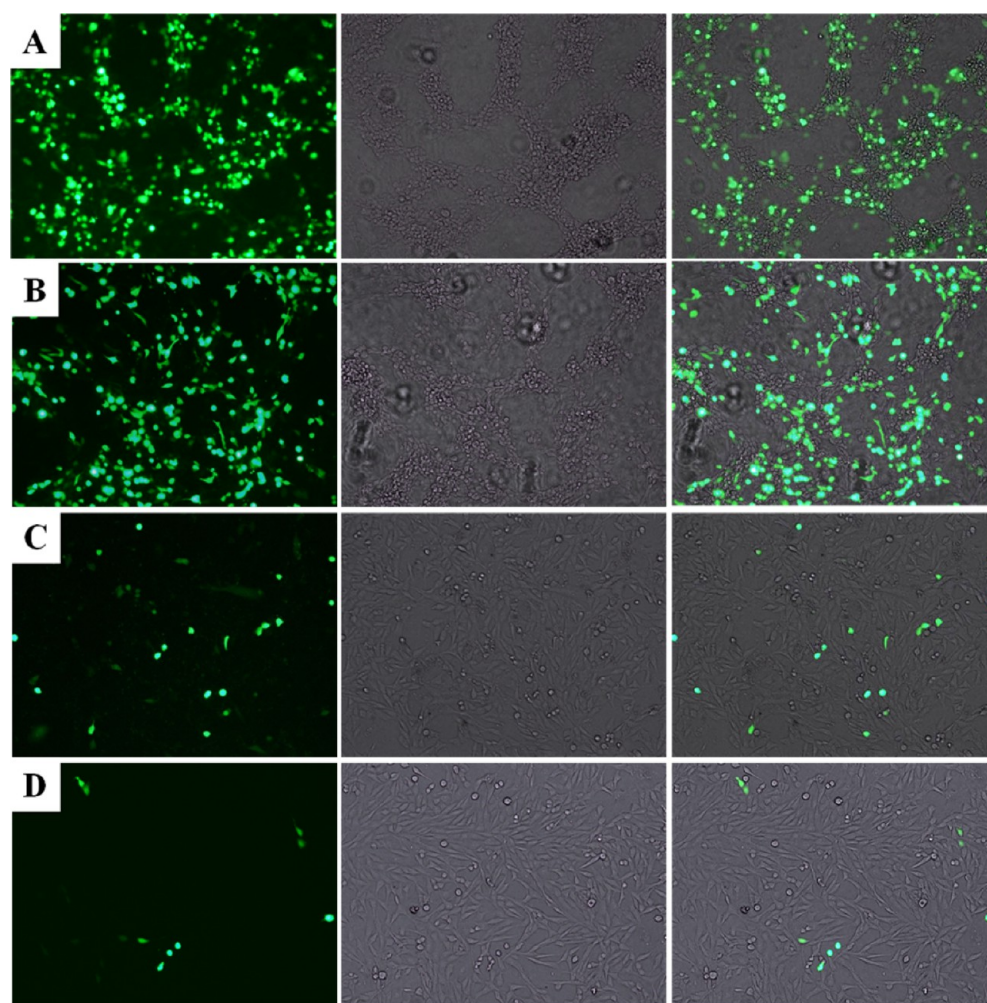


**Figure 4.** Flow cytometric analysis of EGFP knockdown in anti-GFP siRNA (50 nM) transfections of EGFP expressing HEK 293T cells in the presence of serum (10% FBS) by means of coliposomes of three GCLs  $[(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4; n = 1, 2, \text{ or } 3]$  with MOG at (A) various compositions ( $\alpha = 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, \text{ and } 0.12$ ) at the effective charge ratio ( $\rho_{\text{eff}}$ ) of 6 and (B) at various effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 2, 4, 6, \text{ and } 8$ ) for the liposome molar fraction ( $\alpha = 0.12$ ). The EGFP downregulation analysis in EGFP expressing HeLa (C) and H1299 (D) cells at  $\rho_{\text{eff}} = 2, 4, 6, \text{ and } 8$  for  $\alpha = 0.12$ . The cells transfected with anti-GFP siRNA alone and the lipoplexes of L2K-control siRNA served as controls in the experiments.

phenomenon was assessed in terms of the EGFP down-regulation in EGFP expressing HEK 293T cell line by means of anti-GFP siRNA transfection.<sup>44,59</sup> The siRNA transfection experiments involved various liposomal molar fractions ( $\alpha$ ) of GCL and MOG ( $\alpha = 0.30, 0.25, 0.20, 0.15, \text{ and } 0.12$ ) with and without Pluronic F127 (10% of GCL), which were used for the preparation of siRNA lipoplexes at different charge ratios ( $\rho = 2, 4, 6, \text{ and } 8$ ). Lipofectamine 2000 (L2K, a commercial lipofection reagent) mediated anti-GFP siRNA transfections were used as positive controls. Also, control siRNA (non-targeting siRNA) transfections were used as negative controls. At first, the anti-GFP siRNA transfection experiments were performed in the absence of serum using liposomal formulations with and without Pluronic F127. The gemini lipid formulations containing Pluronic F127 showed relatively higher EGFP down-regulation than those without Pluronic F127 (Figure S6). Thus, we carried on with liposomes containing Pluronic F127 for subsequent siRNA transfection experiments. All the coliposomes of three gemini cationic lipids showed maximum EGFP downregulation ( $>80\%$ ) at GCL molar fractions ( $\alpha$ )  $\alpha = 0.12$  and  $0.15$  and effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ) of 6 and 8. On the one hand, the silencing activities of GCLs were even significantly better than the commercial

formulation, L2K (Figure S6). On the other hand, no such EGFP down-regulation was observed in the case of control siRNA (nontargeting) experiments, where the EGFP expression levels remained comparable to that of the untreated cells (Figure S6).

The serum is a well-known impediment in the cationic liposome-mediated cellular delivery of nucleic acids. Thus, the liposomal transfer tools that help the siRNA molecules in protecting from degradation by serum nucleases are desirable for the successful RNA interference (RNAi).<sup>21</sup> In the presence of serum, all the GCL formulations maintained their gene-silencing activity  $[(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_n C_2H_4 \text{ with } n = 1 \text{ and } 3; \text{ more than } 80\% \text{ downregulation and } (C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_2 C_2H_4; \sim 70\% \text{ downregulation}]$ , while it was significantly hampered for L2K ( $\sim 50\%$ ; Figures 4 and S6). The siRNA transfection capability of all three GCL formulations was also investigated in two more EGFP expressing cell lines, that is, HeLa (cervical carcinoma) and H1299 (human lung cancer) cells in the presence of serum for coliposome composition, which showed maximum downregulation ( $\alpha = 0.12$ ) at different effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 2, 4, 6, \text{ and } 8$ ). In HeLa and H1299 cells also, the coliposomes showed significant EGFP downregulation ( $\geq 80\%$ ) at  $\rho_{\text{eff}} = 6$  and  $8$  (Figure 4C,D). These observations



**Figure 5.** Representative fluorescence microscopic images of EGFP expressing HeLa cells (A) and those transfected with anti-GFP siRNA (50 nM) in the presence of serum (10% FBS) by means of coliposomes of  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_1C_2H_4$  with MOG at  $\alpha = 0.12$  and at the effective charge ratio of 8 (D). The cells transfected with only anti-GFP siRNA (B) and the lipoplexes of L2K-anti-GFP siRNA (C) served as controls in the experiment. Each panel (left to right) represents EGFP fluorescence, bright field images, and composite of previous two impressions.

revealed that the siRNA lipoplexes of current GCL-based liposomes could significantly transfect cell lines of different origin in the presence of serum. Such transfection activity has always been desirable in liposomal nanovector-mediated transfections because the mitigated lipofection is a well-known phenomenon for the transfections performed in the presence of serum including the potent commercial lipofection reagent Lipofectamine 2000.<sup>60</sup> The sustained activity of transfection vectors in the presence of serum is one of the major determinants for their potential use in *in vivo* applications.<sup>61</sup> Thus, these GCL/MOG liposomes are promising candidates to be used as potent siRNA delivery tools.

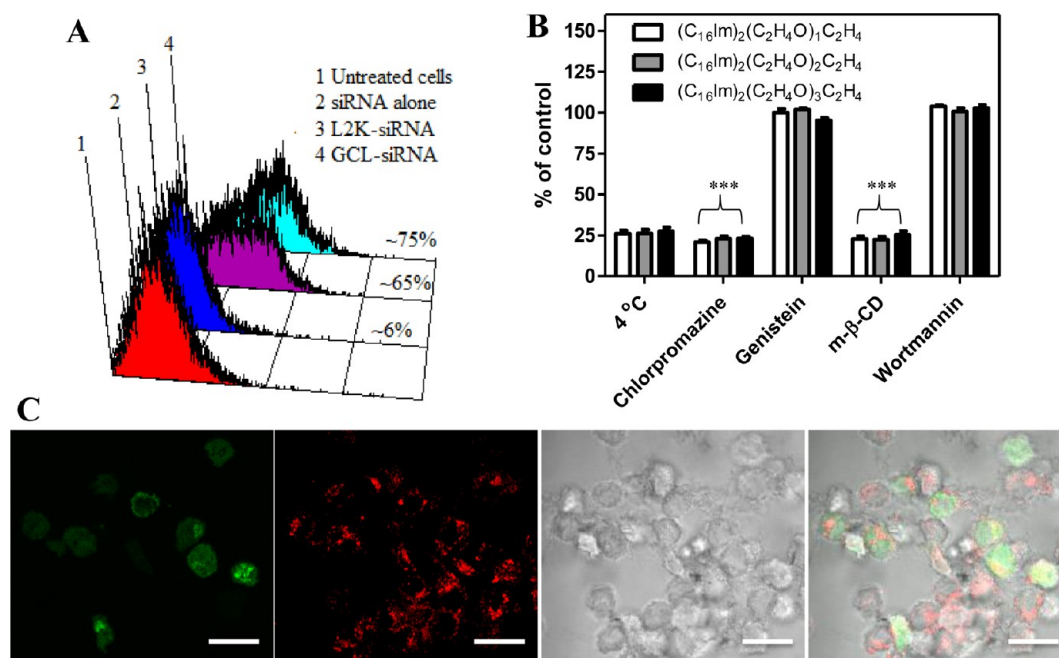
The visual analysis of EGFP silencing activity of GCLs was performed by fluorescence microscopy. The anti-GFP siRNA transfections mediated by optimized GCL molar fractions ( $\alpha$ ) showed a significant downregulation of EGFP expression, which was consistent with the observations made under flow cytometric analysis. On the one hand, the EGFP downregulation in L2K-mediated transfections was relatively lower than that of the optimized GCL formulations. On the other hand, no such EGFP knockdown was observed in control siRNA experiments. The representative images under fluorescence microscopic analysis of EGFP expressing HeLa cells

and after transfection of anti-GFP siRNA with coliposomes of  $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_1C_2H_4$  in comparison with L2K are shown in Figure 5 (images of EGFP expressing HEK 293T cells are reported in Figure S7).

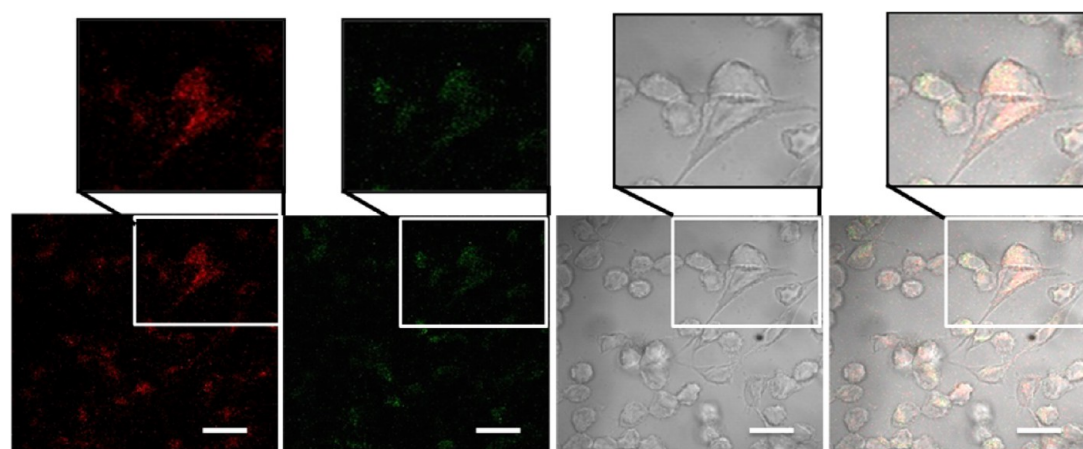
To subsequently examine the cellular uptake and mode of cellular internalization, we used Cy-3 labeled siRNA for the preparation of lipoplexes. The labeled siRNA-lipoplex internalization in HeLa cells [ $(C_{16}Im)_2(C_2H_4O)_1C_2H_4$ ;  $\alpha = 0.12$ ,  $\rho_{eff} = 8$  and 4 h incubation with cells] was first monitored by means of flow cytometry. As shown in Figure 6A, significant intracellular siRNA fluorescence was observed for the GCL-siRNA-lipoplex treatment. The treatment with L2K served as a positive control in the experiment. The cellular internalization of labeled siRNA molecules into EGFP expressing cells was also corroborated by confocal microscopy experiment (Figure 6C).

We then advanced the studies to probe the mechanism of cellular uptake of these lipoplexes using flow cytometry. At first the lipoplex treatment was made at low temperature (4 °C), wherein the cellular uptake was significantly reduced for the lipoplexes of all the three GCL coliposomes (~75%), which suggested the cellular uptake to be energy-dependent (Figure 6B). On the one hand, the pretreatment of cells with inhibitor drugs chlorpromazine (clathrin-mediated endocytosis) and





**Figure 6.** (A) Representative three-dimensional flow cytometry histograms depicting the intracellular Cy-3 siRNA fluorescence for transfections mediated by GCL, (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>1</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>;  $\alpha = 0.12$ ,  $\rho_{\text{eff}} = 8$  in comparison with L2K and siRNA alone treatments. (B) The cellular uptake of lipoplexes of different GCL coliposomes at low temperature (4 °C) and in the presence of various endocytic inhibitors. The transfection activity was analyzed for statistical significance in comparison with untreated controls ( $***P < 0.001$ , two-tailed Student's *t* test). (C) The siRNA cellular internalization into EGFP expressing HeLa cells for (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>1</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> mediated treatment for 4 h. The images (left to right) represent EGFP fluorescence, Cy-3 siRNA fluorescence, bright field image, and composite of previous three impressions. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



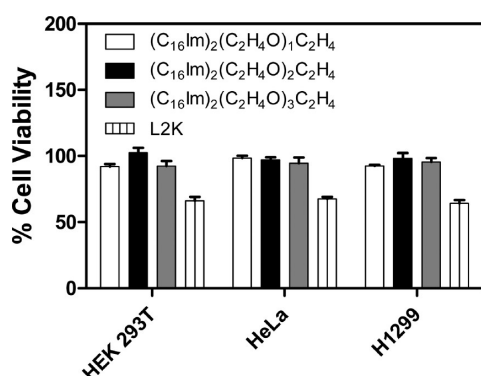
**Figure 7.** Confocal microscopic analysis for intracellular trafficking of lipoplexes (coliposomes of (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>1</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/Cy-3 siRNA;  $\alpha = 0.12$ ,  $\rho_{\text{eff}} = 8$ ) after incubation with HeLa cells for 2 h. The endosomes/lysosomes were counterstained with LysoTracker Green (50 nM). The micrographs (left to right) represent siRNA fluorescence, LysoTracker fluorescence, bright field images, and composite of previous three impressions. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

methyl- $\beta$ -cyclodextrin (cholesterol depletion from the plasma membrane) significantly blocked the uptake of lipoplexes ( $\sim 80\%$ ). On the other hand, pretreatment of cells with genistein (caveolar uptake) and wortmannin (macropinocytotic uptake) had no effect on cellular uptake of lipoplexes (Figure 6B). The observation suggested that the GCL coliposome-based lipoplexes routed via clathrin-mediated endocytosis, which involves endosomes/lysosomes for cellular entry.<sup>62,63</sup> To further demonstrate the observation we performed confocal microscopic experiments, wherein LysoTracker-Green (50 nM) was used for the staining of endosomes/lysosomes after lipoplex treatment for 2 h. It reported that the siRNA fluorescence was colocalized with the fluorescence of

LysoTracker (Figure 7), which in turn suggested endocytosis-dependent cellular entry of lipoplexes.<sup>63,64</sup>

The suitable liposomal formulations for gene delivery purposes should be ideally devoid of any cytotoxic response for further practical applications in vivo.<sup>65</sup> Use of such nontoxic siRNA delivery tools would improve the therapeutic potential of siRNA-based gene therapy protocols. Thus, we performed the cell viability assay (MTT) after 48 h of transfection on the cells incubated with siRNA lipoplexes of optimized GCL compositions for 4 h. In none of the cell lines used for transfection studies, we observed any obvious cytotoxic response posed by siRNA lipoplexes (Figure 8). It suggests

that these coliposomes of GCL and MOG are significantly biocompatible and may be useful for relevant applications.



**Figure 8.** Cell viability counts of HEK 293T, HeLa, and H1299 cells after transfection in the presence of serum (10% FBS) with siRNA-lipoplexes prepared from coliposomes of [(C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>; *n* = 1, 2, and 3] with MOG at  $\alpha = 0.12$  and at effective charge ratio,  $\rho_{\text{eff}} = 8.0$ . The treatments mediated by L2K-siRNA lipoplexes served as positive controls in the experiment.

**Structure–Activity Relationship.** The structure of lipoplexes formed by the gene vector and the compacted nucleic acid depends significantly on the molecular characteristics of their components (cationic lipids, zwitterionic lipids, and the nucleic acid), and obviously, it in turn affects the transfection efficacy in delivering the nucleic acids to the cells.<sup>27,28,30,66</sup> In the panorama, SAXS and cryo-TEM methods provide extensive and fruitful information about the structures of the lipoplexes that may be outlined as follows: irrespective of the nucleic acid (long pDNA or short siRNA molecules) used, most of the cationic lipids mixed with a zwitterionic helper lipid form: (a) lamellar  $L_{\alpha}$  structures, in the whole range of the molar fraction ( $\alpha$ ) of the mixed lipid, when the zwitterionic helper lipid belongs to the phosphatidylcholine family (e.g., DOPC),<sup>67</sup> but (b) with the zwitterionic helper lipid belonging to the phosphatidylethanolamine family (e.g., DOPE), the lipoplexes form inverted hexagonal  $H_{II}$  structures, at low molar fraction ( $\alpha$ ), and lamellar ones, at moderate-to-high  $\alpha$  values.<sup>29,30,68,69</sup> However, in siRNA-mediated silencing studies, in which the lipoplexes are constituted by the combination of a short siRNA (20–24 bp) and a neutral helper lipid, as MOG, also results in a lamellar structure at moderate-to-high molar fraction ( $\alpha$ ) but at very low  $\alpha$  values (high MOG contents, i.e.,  $\alpha \leq 0.15$ ) gyroid inverted cubic structures have been found.<sup>70</sup> In general, it was earlier assumed that inverted hexagonal (for gene transfection) and cubic (for gene silencing) structures were more efficient than the lamellar ones. The high silencing efficacy shown by the cubic phases has been attributed to their propensity to an enhanced fusion with the endosomal membranes by the CL-based cubic phase existing at high MOG contents.<sup>34,70</sup> Thus, the confinement of the CL/MOG-siRNA complexes within the small endosomal compartments increases the number of intermembrane collisions required for fusion. The preference of MOG for cubic bicontinuous phases increases the ability of the lipid membranes to form pores, while the CL increases the electrostatic attraction to the negatively charged endosomal membranes. As a result of both processes, there should be a promotion of the fusion between the outer membranes of CL-siRNA complexes and the endosomal membranes, which should result in an efficient delivery of siRNA in the cytoplasm.

All the previous considerations were confirmed in the (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/MOG-siRNA (with *n* = 1, 2, and 3) lipoplexes studied in this work. In this regard, the highest knockdown efficacy was found for the very low molar fractions  $\alpha$  (0.12–0.15), where the *Ia3d* gyroid bicontinuous inverted cubic structure was found by SAXS (in most lipoplexes in coexistence with the other *Pm3n* cubic phase), while at higher  $\alpha$  values (>0.2) the knockdown efficacy decreased considerably. Nevertheless, the optimum formulation for all the lipoplexes still possessed much higher activity than the L2K positive control. All these features point to the (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> series of the GCLs, reported in the present work, to be considered as attractive gene vectors to be used in nucleic acid-based therapeutic applications.

## CONCLUSIONS

The lipoplexes formed by siRNA and (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/MOG mixed lipids (with *n* = 1, 2, or 3) have been characterized to establish: (i) the relationship between size, structure, fluidity, and the interaction between the components of the gene vectors; (ii) to analyze the cellular uptake/delivery of siRNA; and (iii) to report the EGFP knockdown efficacy in a biocompatible manner. SAXS diffractograms have shown the formation of three lyotropic liquid crystal phases that coexist at certain GCL molar fractions of the mixed lipids in the nanovector. At low  $\alpha$  (high content on MOG), two cubic phases are present: one bicontinuous double gyroid cubic phase ( $Q_{II}^G$ ) and a micellar cubic phase belonging to the *Ia3d* and *Pm3n* crystallographic space groups, respectively. When the GCL molar fraction increases, a phase transition from both *Ia3d* and *Pm3n* cubic phases into lamellar  $L_{\alpha}$  one occurs. Cryo-TEM experiments conclude that with the increase in the spacer length (*n*) of the GCL, certain contributions of cluster-type and fingerprint multilamellar patterns are observed. The in vitro biological studies indicate that a short spacer, a very low GCL molar fraction, and a moderate effective charge ratio of the lipoplex increase the silencing activity of these lipidic nanovectors. In the presence of serum, the three (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/MOG-siRNA lipoplexes, with *n* = 1, 2, or 3, show maximum EGFP downregulation (>80%) in EGFP expressing HEK 293T, HeLa, and H1299 cells at GCL molar fractions of  $\alpha = 0.12$  and 0.15, and at effective charge ratios of  $\rho_{\text{eff}} = 6$  and 8. In optimum conditions, the siRNA is compacted by the GCL/MOG nanovectors by forming two cubic structures (*Ia3d* and *Pm3n*) that seem to be well-correlated with a significant siRNA cellular uptake and delivery, accompanied by high cell viability inputs. In summary, on the basis of the in vitro results reported in this work we envisage the utility of these biocompatible lipidic nanocarriers as truly attractive for the siRNA delivery at in vivo platforms.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.6b08823.

SAXS diffractograms and parameters of the structures; fluorescence anisotropy plots and results; and EGFP knockdown in anti-GFP siRNA transfections of EGFP expressing HEK 293T cells by means of mixed lipidic formulations without and with Pluronic F127 of three GCLs with MOG at various molar fractions ( $\alpha$ ) (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*Fax: +918023600529. E-mail: [sb@orgchem.iisc.ernet.in](mailto:sb@orgchem.iisc.ernet.in). (S.B.)

\*Fax: +34913944135. E-mail: [aicart@quim.ucm.es](mailto:aicart@quim.ucm.es). (E.A.)

### Author Contributions

<sup>#</sup>These authors contributed equally. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

### Funding

MECD of Spain (Project Nos. ACI2009–0867 and CTQ2012–30821), DST of India (Project No. DST/INT/SPAIN/P-8/2009), and University Complutense of Madrid (Spain; Project No. UCMA05–33–010).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

SAXS experiments were performed at NCD11 beamline at ALBA Synchrotron Light Facility, Barcelona (Spain) with collaboration of ALBA staff, while cryo-TEM experiments were performed at Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma, Barcelona (Spain).

## REFERENCES

- Anderson, W. F. Human Gene Therapy. *Nature* **1998**, *392*, 25–30.
- Lasic, D. D. *Liposomes in Gene Delivery*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
- Montier, T.; Benvegna, T.; Jaffres, P. A.; Yaouanc, J. J.; Lehn, P. Progress in Cationic Lipid-Mediated Gene Transfection: A Series of Bio-Inspired Lipids as an Example. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 296–312.
- Verma, I. M.; Weitzman, M. D. Gene Therapy: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711–738.
- Dias, R. S.; Lindman, B. *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*; Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2008.
- Donkuru, M.; Badea, I.; Wettig, S.; Verrall, R.; Elsabahy, M.; Foldvari, M. Advancing Nonviral Gene Delivery: Lipid- and Surfactant-Based Nanoparticle Design Strategies. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1103–1127.
- Karmali, P. P.; Chaudhuri, A. Cationic Liposomes as Non-Viral Carriers of Gene Medicines: Resolved Issues, Open Questions, and Future Promises. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27*, 696–722.
- Kirby, A. J.; Camilleri, P.; Engberts, J.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M.; Soderman, O.; Bergsma, M.; Bell, P. C.; Fielden, M. L.; Garcia Rodriguez, C. L.; Guedat, P.; Kremer, A.; McGregor, C.; Perrin, C.; Ronsin, G.; van Eijk, M. C. P. Gemini Surfactants: New Synthetic Vectors for Gene Transfection. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1448–1457.
- Nicolazzi, C.; Garinot, M.; Mignet, N.; Scherman, D.; Bessodes, M. Cationic Lipids for Transfection. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1263–1277.
- Ewert, K.; Slack, N. L.; Ahmad, A.; Evans, H. M.; Lin, A. J.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. Cationic Lipid-DNA Complexes for Gene Therapy: Understanding the Relationship between Complex Structure and Gene Delivery Pathways at the Molecular Level. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 133–149.
- Junquera, E.; Aicart, E. Cationic Lipids as Transfecting Agents of DNA in Gene Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 649–663.
- Kesharwani, P.; Gajbhiye, V.; Jain, N. K. A Review of Nanocarriers for the Delivery of Small Interfering RNA. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7138–7150.
- Khurana, B.; Goyal, A. K.; Budhiraja, A.; Arora, D.; Vyas, S. P. siRNA Delivery Using Nanocarriers - an Efficient Tool for Gene Silencing. *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 139–155.
- Islam, M. A.; Park, T. E.; Singh, B.; Maharjan, S.; Firdous, J.; Cho, M. H.; Kang, S. K.; Yun, C. H.; Choi, Y. J.; Cho, C. S. Major Degradable Polycations as Carriers for DNA and siRNA. *J. Controlled Release* **2014**, *193*, 74–89.
- Bouxsein, N. F.; McAllister, C. S.; Ewert, K. K.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. Structure and Gene Silencing Activities of Monovalent and Pentavalent Cationic Lipid Vectors Complexed with siRNA. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4785–4792.
- Devi, G. R. siRNA -Based Approaches in Cancer Therapy. *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 819–829.
- Junquera, E.; Aicart, E. Recent Progress in Gene Therapy to Deliver Nucleic Acids with Multivalent Cationic Vectors. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *233*, 161–175.
- Ryther, R. C. C.; Flynt, A. S.; Phillips, J. A.; Patton, J. G. siRNA Therapeutics: Big Potential from Small siRNAs. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 5–11.
- Canine, B. F.; Wang, Y. H.; Ouyang, W. Y.; Hatefi, A. Development of Targeted Recombinant Polymers That Can Deliver siRNA to the Cytoplasm and Plasmid DNA to the Cell Nucleus. *J. Controlled Release* **2011**, *151*, 95–101.
- Dominska, M.; Dykxhoorn, D. M. Breaking Down the Barriers: siRNA Delivery and Endosome Escape. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1183–1189.
- Kanasty, R.; Dorkin, J. R.; Vegas, A.; Anderson, D. Delivery Materials for siRNA Therapeutics. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 967–977.
- Bhattacharya, S.; Bajaj, A. Advances in Gene Delivery through Molecular Design of Cationic Lipids. *Chem. Commun.* **2009**, 4632–4656.
- Wettig, S. D.; Verrall, R. E.; Foldvari, M. Gemini Surfactants: A New Family of Building Blocks for Non-Viral Gene Delivery Systems. *Curr. Gene Ther.* **2008**, *8*, 9–23.
- Safinya, C. R.; Ewert, K. K.; Majzoub, R. N.; Leal, C. Cationic Liposome-Nucleic Acid Complexes for Gene Delivery and Gene Silencing. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 5164–5172.
- Sharma, V. D.; Ilies, M. A. Heterocyclic Cationic Gemini Surfactants: A Comparative Overview of Their Synthesis, Self-Assembling, Physicochemical, and Biological Properties. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 1–44.
- Barran-Berdon, A. L.; Misra, S. K.; Datta, S.; Muñoz-Ubeda, M.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. Cationic Gemini Lipids Containing Polyoxyethylene Spacers as Improved Transfecting Agents of Plasmid DNA in Cancer Cells. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4640–4652.
- Kumar, K.; Barran-Berdon, A. L.; Datta, S.; Muñoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. A Delocalizable Cationic Headgroup Together with an Oligo-Oxyethylene Spacer in Gemini Cationic Lipids Improves Their Biological Activity as Vectors of Plasmid DNA. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 1495–1506.
- Misra, S. K.; Muñoz-Ubeda, M.; Datta, S.; Barran-Berdon, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. Effects of a Delocalizable Cation on the Headgroup of Gemini Lipids on the Lipoplex-Type Nano-Aggregates Directly Formed from Plasmid DNA. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3951–3963.
- Muñoz-Ubeda, M.; Misra, S. K.; Barran-Berdon, A. L.; Aicart-Ramos, C.; Sierra, M. B.; Biswas, J.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. Why Is Less Cationic Lipid Required to Prepare Lipoplexes from Plasmid DNA Than Linear DNA in Gene Therapy? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18014–18017.
- Muñoz-Ubeda, M.; Misra, S. K.; Barran-Berdon, A. L.; Datta, S.; Aicart-Ramos, C.; Castro-Hartmann, P.; Kondaiah, P.; Junquera, E.; Bhattacharya, S.; Aicart, E. How Does the Spacer Length of Cationic Gemini Lipids Influence the Lipoplex Formation with Plasmid DNA? Physicochemical and Biochemical Characterizations and Their Relevance in Gene Therapy. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3926–3937.
- Ahmad, A.; Evans, H. M.; Ewert, K.; George, C. X.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. New Multivalent Cationic Lipids Reveal Bell Curve



for Transfection Efficiency Versus Membrane Charge Density: Lipid-DNA Complexes for Gene Delivery. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 739–748.

(32) Salvati, A.; Ciani, L.; Ristori, S.; Martini, G.; Masi, A.; Arcangeli, A. Physico-Chemical Characterization and Transfection Efficacy of Cationic Liposomes Containing the PEGFP Plasmid. *Biophys. Chem.* **2006**, *121*, 21–29.

(33) Caracciolo, G.; Amenitsch, H. Cationic Liposome/DNA Complexes: From Structure to Interactions with Cellular Membranes. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*, 815–829.

(34) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. Highly Efficient Gene Silencing Activity of siRNA Embedded in a Nanostructured Gyroid Cubic Lipid Matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16841–16847.

(35) Oliveira, A. C. N.; Raemdonck, K.; Martens, T.; Rombouts, K.; Simon-Vazquez, R.; Botelho, C.; Lopes, I.; Lucio, M.; Gonzalez-Fernandez, A.; Real Oliveira, M.; Gomes, A. C.; Braeckmans, K. Stealth Monoolein-Based Nanocarriers for Delivery of siRNA to Cancer Cells. *Acta Biomater.* **2015**, *25*, 216–229.

(36) Silva, J. P. N.; Oliveira, I.; Oliveira, A. C. N.; Lucio, M.; Gomes, A. C.; Coutinho, P. J. G.; Oliveira, M. E. C. D. R. Structural Dynamics and Physicochemical Properties of PDNA/DODAB: Mo Lipoplexes: Effect of pH and Anionic Lipids in Inverted Non-Lamellar Phases Versus Lamellar Phases. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2014**, *1838*, 2555–2567.

(37) Oliveira, A. C. N.; Martens, T. F.; Raemdonck, K.; Adati, R. D.; Feitosa, E.; Botelho, C.; Gomes, A. C.; Braeckmans, K.; Real Oliveira, M. E. C. D. R. Dioctadecyldimethylammonium: Monoolein Nanocarriers for Efficient in Vitro Gene Silencing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 6977–6989.

(38) Al-Dosari, M. S.; Gao, X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J.* **2009**, *11*, 671–681.

(39) Gomes-da-Silva, L. C.; Fonseca, N. A.; Moura, V.; de Lima, M. C. P.; Simoes, S.; Moreira, J. N. Lipid-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Cancer Therapy: Paradigms and Challenges. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1163–1171.

(40) Bednar, J.; Woodcock, C. L. Chromatin. In *Methods in Enzymology*; Wassarman, P. M., Wolffe, A. P., Eds.; Academic Press Inc: San Diego, CA, 1999; Vol. 304, pp 191–213.

(41) Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Q. Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129–228.

(42) Dubochet, J.; Zuber, B.; Eltsov, M.; Bouchet-Marquis, C.; Al-Amoudi, A.; Livolant, F. How to "Read" a Vitreous Section. *Methods Cell Biol.* **2007**, *79*, 385–406.

(43) Rodriguez-Pulido, A.; Aicart, E.; Junquera, E. Electrochemical and Spectroscopic Study of Octadecyltrimethylammonium Bromide/DNA Surfactoplexes. *Langmuir* **2009**, *25*, 4402–4411.

(44) Kumar, K.; Maiti, B.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. Efficacious Gene Silencing in Serum and Significant Apoptotic Activity Induction by Survivin Downregulation Mediated by New Cationic Gemini Tocopheryl Lipids. *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 351–361.

(45) Ewert, K. K.; Evans, H. M.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. Dendritic Cationic Lipids with Highly Charged Headgroups for Efficient Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 877–888.

(46) Barran-Berdon, A. L.; Muñoz-Ubeda, M.; Aicart-Ramos, C.; Perez, L.; Infante, M. R.; Castro-Hartmann, P.; Martin-Molina, A.; Aicart, E.; Junquera, E. Ribbon-Type and Cluster-Type Lipoplexes Constituted by a Chiral Lysine Based Cationic Gemini Lipid and Plasmid DNA. *Soft Matter* **2012**, *8*, 7368–7380.

(47) Badwaik, V. D.; Aicart, E.; Mondjinou, Y. A.; Johnson, M. A.; Bowman, V. D.; Thompson, D. H. Structure-Property Relationship for in Vitro siRNA Delivery Performance of Cationic 2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin: PEG-PPG-PEG Polyrotaxane Vectors. *Biomaterials* **2016**, *84*, 86–98.

(48) Briggs, J.; Chung, H.; Caffrey, M. The Temperature-Composition Phase Diagram and Mesophase Structure Characterization of the Monoolein/Water System. *J. Phys. II* **1996**, *6*, 723–751.

(49) Larsson, K. 2 Cubic Phases in Monoolein Water-System. *Nature* **1983**, *304*, 664–664.

(50) Kulkarni, C. V.; Wachter, W.; Iglesias-Salto, G.; Engelskirchen, S.; Ahualli, S. Monoolein: A Magic Lipid? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 3004–3021.

(51) Li, S. D.; Huang, L. Nanoparticles Evading the Reticuloendothelial System: Role of the Supported Bilayer. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788*, 2259–2266.

(52) Zana, R.; Xia, J. *Gemini Surfactants*; Marcel Dekker, Inc: New York, 2004; Vol. 117.

(53) Guillot, S.; Salentinig, S.; Chemelli, A.; Sagalowicz, L.; Leser, M. E.; Glatter, O. Influence of the Stabilizer Concentration on the Internal Liquid Crystalline Order and the Size of Oil-Loaded Monolinolein-Based Dispersions. *Langmuir* **2010**, *26*, 6222–6229.

(54) Yagmur, A.; de Campo, L.; Salentinig, S.; Sagalowicz, L.; Leser, M. E.; Glatter, O. Oil-Loaded Monolinolein-Based Particles with Confined Inverse Discontinuous Cubic Structure (Fd3m). *Langmuir* **2006**, *22*, 517–521.

(55) Liu, Q. T.; Dong, Y. D.; Hanley, T. L.; Boyd, B. J. Sensitivity of Nanostructure in Charged Cubosomes to Phase Changes Triggered by Ionic Species in Solution. *Langmuir* **2013**, *29*, 14265–14273.

(56) Biswas, J.; Bajaj, A.; Bhattacharya, S. Membranes of Cationic Gemini Lipids Based on Cholesterol with Hydroxyl Headgroups and Their Interactions with DNA and Phospholipid. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 478–486.

(57) Rodriguez-Pulido, A.; Martin-Molina, A.; Rodriguez-Beas, C.; Llorca, O.; Aicart, E.; Junquera, E. A Theoretical and Experimental Approach to the Compaction Process of DNA by Dioctadecyldimethylammonium Bromide/Zwitterionic Mixed Liposomes. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15648–15661.

(58) Bhattacharya, S.; Haldar, S. The Effects of Cholesterol Inclusion on the Vesicular Membranes of Cationic Lipids. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1996**, *1283*, 21–30.

(59) Malamas, A. S.; Gujrati, M.; Kummitha, C. M.; Xu, R. Z.; Lu, Z. R. Design and Evaluation of New pH-Sensitive Amphiphilic Cationic Lipids for siRNA Delivery. *J. Controlled Release* **2013**, *171*, 296–307.

(60) Chan, C. L.; Ewert, K. K.; Majzoub, R. N.; Hwu, Y. K.; Liang, K. S.; Leal, C.; Safinya, C. R. Optimizing Cationic and Neutral Lipids for Efficient Gene Delivery at High Serum Content. *J. Gene Med.* **2014**, *16*, 84–96.

(61) Wang, C. F.; Feng, M.; Deng, J. J.; Zhao, Y. F.; Zeng, X.; Han, L. N.; Pan, S. R.; Wu, C. B. Poly(Alpha-Glutamic Acid) Combined with Polycation as Serum-Resistant Carriers for Gene Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *398*, 237–245.

(62) Huth, U. S.; Schubert, R.; Peschka-Suss, R. Investigating the Uptake and Intracellular Fate of pH-Sensitive Liposomes by Flow Cytometry and Spectral Bio-Imaging. *J. Controlled Release* **2006**, *110*, 490–504.

(63) Li, Y.; Liu, R. Y.; Shi, Y. J.; Zhang, Z. Z.; Zhang, X. Zwitterionic Poly(Carboxybetaine)-Based Cationic Liposomes for Effective Delivery of Small Interfering RNA Therapeutics without Accelerated Blood Clearance Phenomenon. *Theranostics* **2015**, *5*, 583–596.

(64) Liu, H. M.; Li, Y.; Mozhi, A.; Zhang, L.; Liu, Y. L.; Xu, X.; Xing, J. M.; Liang, X. J.; Ma, G. H.; Yang, J.; Zhang, X. Sirna-Phospholipid Conjugates for Gene and Drug Delivery in Cancer Treatment. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6519–6533.

(65) Tseng, Y. C.; Mozumdar, S.; Huang, L. Lipid-Based Systemic Delivery of siRNA. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 721–731.

(66) Foldvari, M.; Badea, I.; Wettig, S.; Verrall, R.; Bagonluri, M. Structural Characterization of Novel Gemini Non-Viral DNA Delivery Systems for Cutaneous Gene Therapy. *J. Exp. Nanosci.* **2006**, *1*, 165–176.

(67) Shirazi, R. S.; Ewert, K. K.; Leal, C.; Majzoub, R. N.; Bouxsein, N. F.; Safinya, C. R. Synthesis and Characterization of Degradable Multivalent Cationic Lipids with Disulfide-Bond Spacers for Gene Delivery. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 2156–2166.

(68) Koynova, R.; Tarahovsky, Y. S.; Wang, L.; MacDonald, R. C. Lipoplex Formulation of Superior Efficacy Exhibits High Surface Activity and Fusogenicity, and Readily Releases DNA. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2007**, *1768*, 375–386.

(69) Dohmen, C.; Edinger, D.; Fröhlich, T.; Schreiner, L.; Lächelt, U.; Troiber, C.; Rädler, J.; Hadwiger, P.; Vornlocher, H. P.; Wagner, E. Nanosized Multifunctional Polyplexes for Receptor-Mediated siRNA Delivery. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5198–5208.

(70) Leal, C.; Ewert, K. K.; Bouxsein, N. F.; Shirazi, R. S.; Li, Y. L.; Safinya, C. R. Stacking of Short DNA Induces the Gyroid Cubic-to-Inverted Hexagonal Phase Transition in Lipid-DNA Complexes. *Soft Matter* **2013**, *9*, 795–804.

## Accepted Manuscript

Biophysics and protein corona analysis of Janus cyclodextrin-DNA nanocomplexes. Efficient cellular transfection on cancer cells

M. Martínez-Negro, G. Caracciolo, S. Palchetti, D. Pozzi, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, A. Laganà, C. Ortiz Mellet, J.M. Benito, J.M. García Fernández, E. Aicart, E. Junquera

PII: S0304-4165(17)30093-4  
DOI: doi:[10.1016/j.bbagen.2017.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.03.010)  
Reference: BBAGEN 28801

To appear in: *BBA - General Subjects*

Received date: 23 December 2016  
Revised date: 26 February 2017  
Accepted date: 14 March 2017



Please cite this article as: M. Martínez-Negro, G. Caracciolo, S. Palchetti, D. Pozzi, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, A. Laganà, C. Ortiz Mellet, J.M. Benito, J.M. García Fernández, E. Aicart, E. Junquera, Biophysics and protein corona analysis of Janus cyclodextrin-DNA nanocomplexes. Efficient cellular transfection on cancer cells, *BBA - General Subjects* (2017), doi:[10.1016/j.bbagen.2017.03.010](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.03.010)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Biophysics and protein corona analysis of Janus cyclodextrin-DNA  
nanocomplexes. Efficient cellular transfection on cancer cells**

M. Martínez-Negro<sup>a</sup>, G. Caracciolo<sup>b</sup>, S. Palchetti<sup>b</sup>, D. Pozzi<sup>b</sup>, A. L. Capriotti<sup>c</sup>, C. Cavaliere<sup>c</sup>, A. Laganà<sup>c</sup>, C. Ortiz Mellet<sup>d</sup>, J. M. Benito<sup>e</sup>, J. M. García Fernández<sup>e</sup>, E. Aicart<sup>a</sup>, E. Junquera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

<sup>b</sup>Department of Molecular Medicine, “Sapienza” University of Rome, Viale Regina Elena 291, 00161-Rome, Italy

<sup>c</sup>Department of Chemistry, “La Sapienza” University of Rome, Pzle Aldo Moro 5, 00185-Rome, Italy

<sup>d</sup>Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, c/ Profesor García González 1, 41012-Sevilla, Spain

<sup>e</sup>Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), CSIC – Universidad de Sevilla, Avda. Américo Vespucio 49, 41092-Sevilla, Spain

Corresponding Author

\*Fax: +34913944135. E-mail: [junquera@quim.ucm.es](mailto:junquera@quim.ucm.es)

**ABSTRACT**

The self-assembling processes underlining the capabilities of facially differentiated (“Janus”) polycationic amphiphilic cyclodextrins (paCDs) as non-viral gene nanocarriers have been investigated by a pluridisciplinary approach. Three representative Janus paCDs bearing a common tetradecahexanoyl multitail domain at the secondary face and differing in the topology of the cluster of amino groups at the primary side were selected for this study. All of them compact pEGFP-C3 plasmid DNA and promote transfection in HeLa and MCF-7 cells, both in absence and in presence of human serum. The electrochemical and structural characteristics of the paCD-pDNA complexes (CDplexes) have been studied by using zeta potential, DLS, SAXS, and cryo-TEM. paCDs and pDNA, when assembled in CDplexes, render effective charges that are lower than the nominal ones. The CDplexes show a self-assembling pattern corresponding to multilamellar lyotropic liquid crystal phases, characterized by a lamellar stacking of bilayers of the CD-based vectors with anionic pDNA sandwiched among them. When exposed to human serum, either in the absence or in the presence of pDNA, the surface of the cationic CD-based vector becomes coated by a protein corona (PC) whose composition has been analysed by nanoLC-MS/MS. Some of the CDplexes herein studied showed moderate-to-high transfection levels in HeLa and MCF-7 cancer cells combined with moderate-to-high cell viabilities, as determined by FACS and MTT reduction assays. The ensemble of data provides a detail picture of the paCD-pDNA-PC association processes and a rational base to exploit the protein corona for targeted gene delivery on future *in vivo* applications.

**KEYWORDS:** CDplexes, effective charge ratio, multilamellar phases, cellular transfection, cytotoxicity, protein corona

## 1. Introduction

Nucleic acids (DNA or RNA) have become in the last decade an attractive source of therapeutic agents [1]. The interplay of a direct structure-activity relationship and a highly specific mode of action theoretically permit exploiting the cellular machinery in a predictable fashion to either stimulate or silence the expression of virtually any protein, with reduced toxicity and fewer side effects as compared with classical drugs. This is the basis of gene therapy (GT), an exciting branch of medicine that tries to cure diseases (genetic, neurologic, cardiovascular, infectious, or carcinogenic, etc.) at a molecular level, by repairing damaged cellular DNA, either by introducing (by means of a plasmid DNA) and expressing a copy of the affected or missing gene into the cells [2-8] or by inserting a small interfering RNA (siRNA) to silence and stop the expression of an abnormal gene, responsible of the cell disorder [9-12]. Both approaches, either that one based on plasmid DNAs or on siRNAs, constitute nowadays the main strategies of GT on seeking for effectively restore healthy cell functioning.

Conventional drugs consist of bioactive species and a carrier, the former being normally the key of the design strategies. However, in the case of biomolecular drugs, such as nucleic acids, the carrier becomes a decisive protagonist. In the free state, nucleic acids are easily degraded by nucleases in biological fluids [13,14], and their membrane-crossing abilities and cellular uptake are seriously limited by their negative charge, inherently large size, and rigidity [15]. Formulation with appropriate delivery systems is thus essential for nucleic acids to overcome the physiological barriers, reach the target in a fully functional form and carry out the designed therapeutic function. Viral gene vectors [16,17] were first developed towards this end due to their high effectiveness. Yet, the use of viral vectors bear inherent risks, including immunogenicity and oncogenicity, which has boosted research on the design, synthesis, and

characterization of non-viral carriers that may combine high transfection efficiencies with low cytotoxicity levels [18,19]. In addition, for *in vivo* applications, these vectors must remain stable in the presence of blood or serum and, ideally, should be amenable to surface decoration with selective groups in order to recognize the target cells. The majority of non-viral vector formulations on record are based on cationic lipids [19,20], polymers [21], nanoparticles [22], and polysaccharides [12,23]. More recently, gene delivery systems based on 3D molecular frameworks with precisely defined chemical structures, sizes, shape symmetry and functional group distributions have been developed [24-26]. Their intrinsic monodisperse character allows conducting systematic studies on the influence of vector modifications on the supramolecular interactions with nucleic acids and the consequences in transfection efficiencies [1].

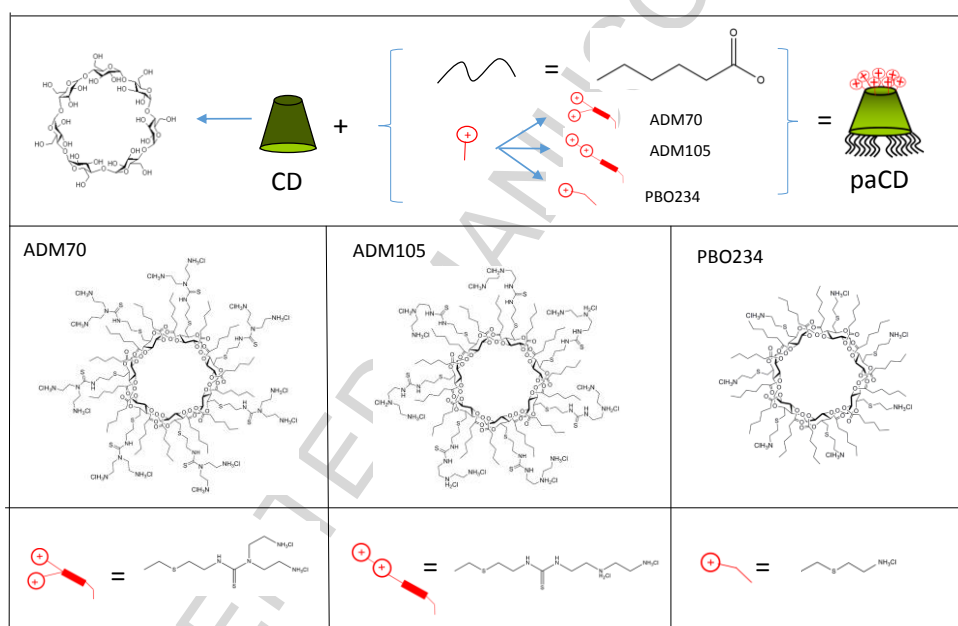
Within the context of molecular gene vectors, facially differentiated (“Janus”) macrocyclic entities [24,26,27], among which cyclodextrin (CD)-based derivatives are paradigmatic examples, have conquered a prominent position [28,29]. CDs are biocompatible cyclic oligosaccharides consisting of  $\alpha$ -1,4-linked glucopyranose units that define a cone-shape topology with well-differentiated faces. The Janus feature can be imparted by bidirectional functionalization with polycationic groups on one rim and hydrophobic chains on the opposite rim. Multihead-multitail polycationic amphiphilic CDs (paCDs) with self-assembling properties and biomimetic cell-membrane-crossing aptitudes, resembling both cationic lipids and cationic polymers, are thus accessed [30,31]. In the presence of nucleic acids, they spontaneously form well-defined supramolecular nanocomplexes (hereinafter referred to as CDplexes) where the gene material is protected from degradation by enzymatic agents. Analogously to the well-known lipoplexes and polyplexes [32], CDplexes can elicit cellular uptake in physiological media and promote transfection [30,31,33,34].

Whereas *in vitro* transfection of immortalized cultured cells can be generally conducted in serum-free medium, some *ex-vivo* and any *in vivo* GT protocol will imply exposing of the nucleic acid-entrapping nanosystems to other biomolecules present in biological fluids. Non-specific interactions with these biomolecules may then decisively affect their fate in a biological environment [35,36]. Indeed, once administered *in vivo*, the nanovectors are exposed to the biological fluids from which they adsorb proteins and other components, losing the bare vector identity to form a biologically active corona, known as the *protein corona* (PC) [37,38]. This PC plays an important role in both the cellular recognition [39] and cell-membrane crossing capabilities (internalization process) of the nanovector [40]. It has also a clear effect on its time of circulation in the blood, so that knowing the proteomic profile of the corona surrounding a gene vector is crucial to optimize the transfection process. For instance, certain proteins like opsonins and, specially, immunoglobulins, fibrinogen and complement proteins are recognized by the macrophages favoring the phagocytosis and the rapid clearance of the vector from the bloodstream. On the other hand, the adsorption of apolipoproteins and serum albumin (dyopsonins) promote prolonged blood circulation half-life [41]. Successful delivery of therapeutic genes into cells will therefore require not only a high control of the physical-chemical parameters of the vector and vector-DNA nanocomplex, such as effective charges, chemical composition, size and structure, but also a deep knowledge on their interaction with serum proteins, the composition of the resulting PC and its impact in transfection capabilities and toxicity. Notwithstanding, up to date, most studies in this field are centered on the PC that forms around inorganic and organic nanoparticles [40,42-44], with only a few investigations evaluating the PC adsorbed on vector-DNA complexes [45,46].



This work is specifically focused on the biophysical and biochemical characterization of Janus paCD-pDNA CDplexes and their protein corona fingerprints as a function of the molecular paCD vector topology. We have chosen three different paCD representatives with a  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) core, namely compounds **ADM70**, **ADM105** and **PBO234** (Scheme 1). The three molecular vectors share a  $C_7$ -symmetrical skirt-type Janus architecture with a multitail lipophilic domain formed by fourteen hexanoyl groups that esterify the secondary hydroxyls, differing in the architecture of the multivalent cationic cluster installed at the primary positions. Thus, **ADM70** displays a dendritic presentation of fourteen primary amino groups, **ADM105** a linear arrangement of seven secondary and seven primary amino groups and **PBO234** a heptavalent cluster of primary amino groups. **ADM70** and **ADM105** additionally incorporate a belt of seven thiourea groups at the primary face branches. All these structural elements have been previously found to impart good DNA compaction abilities to molecular gene vectors as well as good transfection capabilities to the corresponding vector-DNA complexes *in cellulo* and *in vivo* [33,34]. We have first conducted a deep electrochemical and structural characterization of the bare nanovector and pDNA-loaded Janus paCD assemblies by using high precision experimental techniques including zeta potential, agarose gel electrophoresis, dynamic light scattering (DLS), small angle X-ray scattering (SAXS) and cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM). Given that what cells “see” and process in *in vivo* situation is not the bare complexes but the CDplexes-PC bioentity formed, we have evaluated the PC developed at the surface of CDplexes formulated with the three paCDs herein used when they interact with human plasma (HP), by means of nano liquid chromatography tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Finally, transfection performances of the CDplexes and levels of cellular toxicity were further investigated *in vitro* by

fluorescence-activated cell sorting (FACS) and reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT assay), respectively. The final goal of this pluridisciplinary approach is obtaining a global picture of the optimal requirements for the preparation of the CDplexes, in an attempt of opening alternative trails that provide non-viral vectors with improved outputs of bioavailability and transfection efficiency (TE).



**Scheme 1.** Structural characteristics of ADM70, ADM105 and PBO234.

## 2. Experimental section

### 2.1 Materials

The Janus paCDs used in this study, **ADM70**, **ADM105** and **PBO234** (Scheme 1), were prepared following the procedures previously reported [47]. Briefly, the synthesis of compound **PBO234** was accomplished in four steps (i-iv) from commercially available  $\beta$ -cyclodextrin by (i) heptabromination at the primary hydroxyl rim with the N-bromosuccinimide (NBS)/triphenylphosphine (TPP) system [48], (ii) cesium carbonate promoted nucleophilic displacement of bromine by N-Boc-cysteamine [49],

(iii) acylation of the fourteen secondary hydroxyls by reaction with hexanoic anhydride in N,N-dimethylformamide (DMF) and N,N-dimethylaminopyridine (DMAP) as a non-nucleophilic base catalyst and (iv) final acid-promoted hydrolysis of the *tert*-butyl carbamate groups. Compounds **ADM105** and **ADM70** were obtained from **PBO234** after isothiocyanation of the seven amino groups with thiophosgene [47] followed by thiourea coupling reactions with mono-N-Boc-ethylenediamine or N,N'-di-Boc-ethylenetriamine, respectively, and subsequent Boc removal. The physicochemical data for the three polycationic amphiphilic cyclodextrins were consistent with those previously reported [47]. Most significantly, the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra showed the typical single-spin system for fully  $C_7$ -symmetrical molecules.

pEGFP-C3 Plasmid DNA (pDNA) was extracted from competent *E. Coli* bacteria previously transformed with pEGFP-C3, the extraction being carried out using GenElute HP Select plasmid Gigaprep Kit (Sigma Aldrich) following a protocol previously described [50,51]. Sodium salt of calf thymus DNA (ctDNA), provided by Sigma-Aldrich, was used as linear DNA to determine the effective charge ( $q_{\text{CD}}^+$ ) of the cationic vector.

Human plasma (HP) whole blood provided by the Department of Experimental Medicine of La Sapienza University of Rome, was obtained by venipuncture of ten healthy volunteers. Mixed plasma was aliquoted and stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  in protein LoBind tubes until further use. For analysis, the aliquots were thawed at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  and then allowed to warm at room temperature. Human cervical cancer cell line (HeLa), derived from human cervix adenocarcinoma, and human breast cancer cell line (MCF-7), derived from human pleural effusion breast cancer metastasis, were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). HeLa cells were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL

penicillin/streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 1.5 mg/L sodium bicarbonate, and 10% fetal bovine serum (FBS). MCF-7 cells were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 0.01 mg/ml human recombinant insulin and 10% fetal bovine serum (FBS).

## 2.2 Methods

**2.2.1 Preparation of CDplexes.** paCD-DNA complexes were formed by mixing the correct amounts of aqueous solutions of the paCDs and of DNAs (either ctDNA or pDNA) in HEPES 20 mM (pH = 7.4). The final solutions were left during 20 min prior to carry on the experiments. pDNA concentrations were optimized to fit the optimum conditions for each experimental technique. CDplex composition can be expressed either in terms of the masses ratio  $(m_{CD} / m_{DNA})_{\phi}$ , between mass of the gene vector ( $m_{CD}$ ) to plasmid DNA ( $m_{DNA}$ ), or the effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ), between the paCD and pDNA effective charges.

**2.2.2. Incubation of paCDs with HP, in absence and presence of pDNA.** paCDs were mixed with HP (1:1 v/v) and were incubated at 37 °C for 1 h. After incubation, the samples were centrifuged three times during 15 min at 14000 rpm in order to wash the sample and remove all the molecules not bound to the complex. The same procedure was followed with the CDplexes.

**2.2.3. Methods for the characterization of paCD/pDNA CDplexes.** Uncomplexed plasmid DNA along with the paCD/pDNA CDplexes (at several  $(m_{CD} / m_{pDNA})$  ratios) were loaded onto 1% agarose gel and run for 30 min at 100 mV in 1x TAE (Tris-HCl, Acetate and EDTA) buffer. In the Agarose gel electrophoresis experiments, fully paCD/pDNA complexes appeared as fluorescent band in the wells of the gel, while

uncomplexed pDNA appeared outside the well. Fluorescence intensity of each band was measured by using commercial Quantity One software provided with Gel Doc XR instrument (Bio-Rad). The band intensity for the free pDNA was considered as 100% and other intensities were estimated accordingly.

$\zeta$ -potential measurements (obtained from electrophoretic mobility) for bare CDplexes were carried out at 25 °C, with a Phase Analysis Light Scattering technique (Zeta PALS, Brookhaven Instrum. Corp., USA) [52,53].  $\zeta$ -Potential was measured at different ( $m_{CD} / m_{DNA}$ ) ratios of the CDplexes. Each electrophoretic mobility datum is taken as an average over 50 independent measurements. Size and  $\zeta$ -potential measurements for PC-coated CDplexes (in the presence of HP) were carried out using a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK). CDplex-HP samples (1:1 volume ratio) were previously incubated for 1h at 37 °C. CDplex-protein complexes were separated from excess plasma by centrifugation and extensive washing to remove the unbound proteins. For all of the samples investigated, the data show mostly a unimodal distribution and represent the average of at least five different measurements carried out for each sample. Results are given as means  $\pm$  standard deviation of the five replicates.

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on the beamline NCD11 at ALBA Synchrotron Barcelona (Spain). The energy of the incident beam was 12.6 KeV ( $\lambda = 0.995$  Å). The machine is run in multibunch mode with a filling pattern consisting on 10 trains, 64 ns long and a gap of 24 ns between the trains. Samples were placed in sealed glass capillaries purchased from Hilgenberg with an outside diameter of 1.5 mm and wall thickness of 0.01 mm. The scattered X-ray was detected on CCD detector Quantum 210r, converted to one-dimensional scattering by radial averaging, and represented as a function of the momentum transfer vector. SAXS experiments were run, at several effective charge ratios ( $\rho_{eff}$ ) of the CDplexes.

Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) experiments were run for paCD/pDNA CDplexes following the standard procedure [54,55]. In these experiments, perforated Quantifoil R1.2/1.3 (hole diameter 1.2  $\mu\text{m}$ ) on a 400-mesh copper grid were used. Images were obtained using a Jeol JEM 2011 cryo-electron microscope operated at 200 kV, under low-dose conditions, and using different degrees of defocus (500–700 nm) to obtain an adequate phase contrast [56]. Images were recorded on a Gatan 794 Multiscan digital camera. Finally, the CCD images were processed and analyzed with a Digital Micrograph.

In order to carry on nanoLC-MS/MS analysis, 10  $\mu\text{L}$  peptide mixtures were separated by RP chromatography using the Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corporation Sunnyvale, CA, USA). Samples were on-line preconcentrated on a  $\mu$ -precolumn (Dionex, 300  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  5 mm Acclaim PepMap 100 C18, 5  $\mu\text{m}$  particle size, 100 Å pore size), employing a premixed mobile phase doubled distilled (dd)  $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  98:2 (v/v) containing 0.1% (v/v) TFA at a flow-rate of 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Samples were then separated on an in-house manufactured Acclaim-C18 2.2  $\mu\text{m}$  silica microparticles (75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  25 cm) and outlet Kasil frit. A multi-step gradient was employed for sample chromatography, using dd $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$  (98:2, v/v) with 0.1% TFA as phase A and  $\text{ACN/TFA}$  (99.9/0.1, v/v) as phase B. Starting from 1% phase B, such composition was maintained for 5 min, then phase B was linearly increased to 5% within 2 min; afterwards, phase B was first increased to 20% within 100 min and then to 50% within 43 min; then to 80% within the following 5 min. Phase B was maintained at 80% for 20 min to rinse the column and finally lowered to 1% within 1 min. The column was then equilibrated at this percentage for 43 min. The flow rate was 250  $\text{nL min}^{-1}$  and the total run time was 120 min. The nanoHPLC apparatus was directly connected with an Orbitrap Elite hybrid ion trap-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen,

Germany) by a nano-electrospray ion source for MS/MS analysis of eluting peptides. Orbitrap Elite was operated to collect spectra over  $m/z$  range of 400–1800 Da, at 60,000 (Full Width Half Maximum at  $m/z$  400) resolution, in the data dependent mode. MS/MS spectra were collected in top 20 mode, rejecting +1 and unassigned charge states, using a normalized collision energy of 35%, and an isolation window of 2  $m/z$ . Ion trap and Orbitrap maximum ion injection times were set to 100 and 200 ms, respectively. Automatic gain control was used to prevent overfilling of the ion traps and was set to  $1 \times 10^6$  for full FTMS scan, and  $1 \times 10^4$  ions in MS $_n$  mode for the linear ion trap. To minimize redundant spectral acquisitions, dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1 and a repeat duration of 30 s with exclusion duration of 70 s. For each sample, three technical replicates (LC-MS/MS runs) were performed.

For data analysis and protein validation procedures, raw data files, obtained from Xcalibur software, were submitted to Proteome Discoverer (1.2 version, Thermo Scientific) for database search using Mascot (version 2.3.2 Matrix Science). Data were searched against human entries in the SwissProt protein database (57.15 version, 20266 sequences) selecting the built-in decoy option. Trypsin was specified as the proteolytic enzyme with up to two missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine were set as fixed and variable modification, respectively. The monoisotopic mass tolerance for precursor ions and fragmentation ions were set to 10 ppm and 0.8 Da, respectively. To validate protein identifications derived from MS/MS sequencing results, the Mascot output files (.dat) were submitted in the commercial software Scaffold (v3.1.2, Proteome Software, Portland, Oregon, USA; <http://www.proteomesoftware.com/>). The scaffold tool to integrate Mascot identification results with X!Tandem search engine results (performed in automatic with the same parameters settled for Mascot) was used. Only protein identification based on

mass spectra correlating to at least two unique tryptic peptides were considered; minimum peptide identification probability was set at 95%, whereas protein identification probability was set at 99%. For protein quantitative analysis, Scaffold software allows the normalization of the spectral countings (normalized spectral countings, NSCs) and offers various statistical tests to identify significant abundance differences in two or more categories. The mean value of NSCs obtained in the three experimental replicates for each protein was further normalized to the protein molecular weight (MWNSC) and expressed as the relative protein quantity by applying Eq. (1):

$$MWNSC = \frac{(NSC / MW)}{\sum_{i=1}^N (NSC / MW)} 100 \quad (1)$$

where MWNSC<sub>k</sub> is the percentage molecular weight normalized NSC for protein k, and MW is the molecular weight in kDa for protein k. This correction takes into account the protein size and evaluates the actual contribution of each protein reflecting its relative protein abundance (RPA) in the “hard corona”.

On transfection efficiency analysis, HeLa and MCF-7 cells were seeded in 12-well plate ( $150 \times 10^3$  cells/mL) and treated with paCD/GFP plasmid complexes alone or surrounded by protein corona for 48 h. Then, cells were detached with trypsin/EDTA, washed two times with cold PBS and acquired using a flow cytometer. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed using BD LSRFortessa equipped with 488 nm laser and with DIVA software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were first gated using forward vs side scatter (FSC vs SSC) strategy to exclude debris (low events) and then analyzed for the specific 530 nm emission (FITC channel). Data were analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC data analysis software, Ashland, OR, USA). Transfection efficiencies (TE) were quantified by means of % GFP



cells, i.e., percentage of cells in which GFP expression is observed, and the average intensity of fluorescence per cell (MFI). Lipofectamine was used as a positive control.

Cell viability of HeLa and MCF-7 cell lines was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, mitochondrial respiration analysis; Sigma-Aldrich), according to Mosmann protocol. Briefly, HeLa and MCF-7 cells were seeded on 96-wells plate and, after 24 h, treated with the three paCDs (**ADM70**, **ADM105** and **PBO234**) complexed with pEGFP-C3 plasmid alone or surrounded by protein corona for 24 h. MTT was added to each well at the final concentration of 0.5 mg/mL and after 4 h of incubation at 37 °C, the formazan salt was dissolved with 100 mL isopropanol. The absorbance of each well was measured with Glomax Discovery System (Promega) at 550 nm wavelength and the viability was calculated for each treatment as “OD of treated cells/OD of control cells” x100.

### 3. Results and discussion

Nanocomplex formation between non-viral gene vectors and nucleic acids is primarily driven by coulombic interactions. A proper characterization requires thus determination of the charges available in each partner, which are usually different from the nominal ones defined by the number of potentially ionizable groups. Regarding the oligonucleotide counterpart, studies reported in the literature [3,12,51,53] have shown that linear DNAs, such as commercial calf thymus or salmon sperm DNA, or short siRNAs have their negative charge totally available for the gene vector, i.e.  $q_{linearDNA}^{-} = -2$  per bp. In stark contrast, experiments recently reported [19,20,53] have demonstrated that, at physiological conditions, plasmid DNAs remain in a supercoiled conformation, rendering a much less negative charge than its nominal one ( $q_{pDNA}^{-} \ll -2$ ).

For that reason, the characterization of the CDplexes must start with the determination of the effective charges of both the policationic Janus paCD and the pDNA, when forming the nanocomplex. At this respect, we have implemented a procedure to fulfil this objective based on a two-step protocol to determine: i) firstly, the effective charge of the cationic vector by characterizing the complex formed by this vector and double stranded linear DNA (linear DNA) for which the charge is well established (-2/bp); and ii) on a second step, the effective charge of the pDNA by characterizing the complex formed by the cationic vector, already of known charge (step i), and the pDNA in the same experimental conditions [51-53]. Briefly, the effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ), defined as the quotient between the effective charges of the paCD amino groups and the DNA phosphate groups is given by the following equation:

$$\rho_{eff} = \frac{n^+}{n^-} = \frac{q_{eff,CD}^+(m_{CD} / \overline{M}_{CD})}{q_{eff,DNA}^-(m_{DNA} / \overline{M}_{bp})} \quad (2)$$

where  $n^+$  and  $n^-$  are the number of moles of positive and negative charges of paCD and DNA;  $m_{CD}$  and  $m_{DNA}$  are the masses of the cationic CD based vector and the nucleic acid;  $\overline{M}_{CD}$  and  $\overline{M}_{bp}$  are the molar mass of the vector and the average molar mass of DNA per bp; and  $q_{eff,CD}^+$  and  $q_{eff,DNA}^-$  are the effective charges of paCD and DNA per bp, respectively. When  $n^+$  balances  $n^-$ ,  $\rho_{eff}$  equals 1 and the electroneutrality of the complex is reached. The particular  $(m_{CD} / m_{DNA})$  ratio at which this charge compensation occurs, defined hereinafter as  $(m_{CD} / m_{DNA})_\phi$ , marks the lower limit from which the CDplex becomes a potentially efficient cell transfecting agent, since it turns to a net positively

charged complex, as required to cross the negative cell membrane in an efficient cell transfection process. From Eq. (2), it is easily deduced that  $\rho_{eff} = 1$  requires:

$$q_{eff,CD}^+ = q_{eff,linear\ DNA}^- \left( \frac{m_{CD}}{m_{linear\ DNA}} \right)_\phi^{-1} \frac{\overline{M}_{CD}}{\overline{M}_{bp}} \quad (3)$$

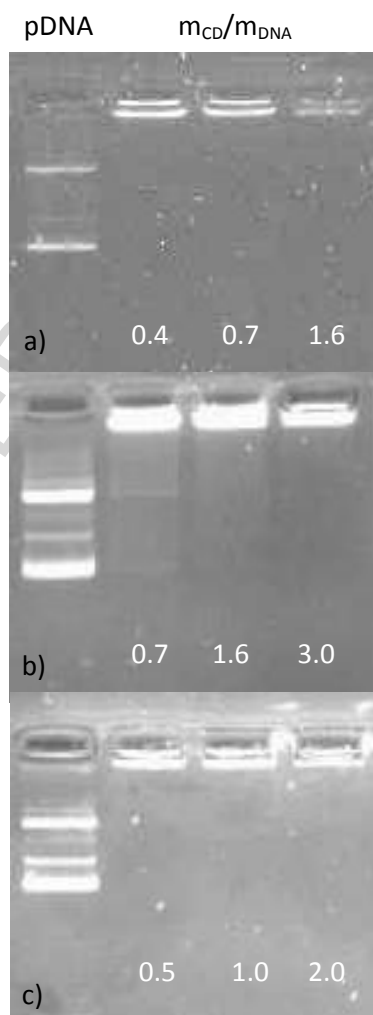
Thus, if the isoneutrality ratio  $(m_{CD} / m_{linear\ DNA})_\phi$  is experimentally determined for a complex formed by a Janus CD-based vector and a commercial linear DNA (for which  $q_{eff,linear\ DNA}^- = -2/\text{bp}$ ), the effective positive charge of the vector ( $q_{eff,CD}^+$ ) can be obtained. Once this charge is known, the negative effective charge of the plasmid ( $q_{eff,p\ DNA}^-$ ) can be straightforwardly determined from the experimental value of  $(m_{CD} / m_{p\ DNA})_\phi$  for a complex formed by the same CD based vector but with a plasmid DNA instead of the linear DNA, on the same experimental conditions, as follows:

$$q_{eff,p\ DNA}^- = q_{eff,CD}^+ \left( \frac{m_{CD}}{m_{p\ DNA}} \right)_\phi \frac{\overline{M}_{bp}}{\overline{M}_{CD}} \quad (4)$$

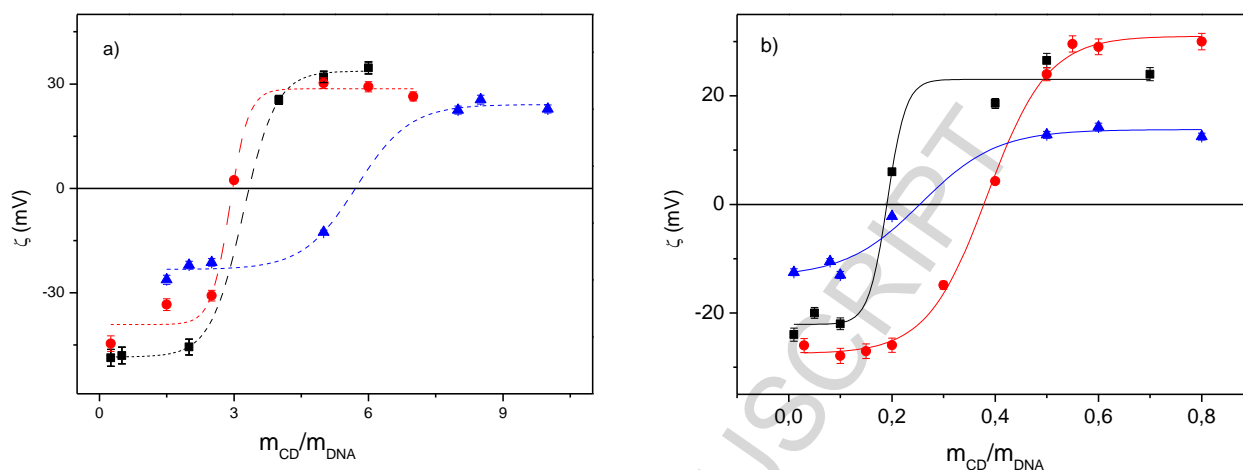
Electrochemical techniques are, among others, the most adequate tools to determine this electroneutrality ratio, agarose gel electrophoresis, and, more precisely, zeta potential, being the most recommended. Agarose gel electrophoresis informs about the compaction level of pDNA by the vectors. Fig.1 reports these experiments at three different  $(m_{CD} / m_{DNA})$  ratios (white numbers on lanes 2-4), for the three paCDs used in this work (**ADM70**, **ADM105** and **PBO234**). Uncomplexed pDNA (lane 1) was used as a positive control. Results reported in Fig. 1 reveal that pDNA is efficiently compacted by the paCD molecular vectors, since the fluorescent bands disappear across the gel lanes as long as  $(m_{CD} / m_{DNA})$  ratio increases. As can be inferred from Fig. 1, the

isoneutrality was reached at  $(m_{CD}/m_{DNA})$  ratios below 0.4, 0.7 and 0.5 for **ADM70**-pDNA, **ADM105**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes, respectively.

With the aim of determining with higher precision the electroneutrality ratio, zeta potential was measured as a function of  $(m_{CD}/m_{DNA})$  (Fig. 2), covering the range within which pDNA is effectively compacted by each paCD, according to the results shown in Fig. 1. The electroneutrality ratio  $(m_{CD}/m_{DNA})_{\phi}$  can be determined as the  $(m_{CD}/m_{DNA})$  value where a sign inversion on the charge occurs in the  $\zeta$ -potential sigmoidal profiles.



**Fig. 1.** Gel electrophoresis results for (a) **ADM70**-pDNA CDplexes, (b) **ADM105**-pDNA CDplexes, and (c) **PBO234**-pDNA CDplexes. Lane 1: uncomplexed pDNA (positive control). Lanes 2-4: CDplexes at different  $m_{CD}/m_{DNA}$  mass ratios (white numbers at the bottom of the lanes).



**Fig. 2.** Plot of  $\zeta$  potential vs  $m_{CD}/m_{DNA}$  CDplex composition, for different samples with ctDNA (a) and pDNA (b). Black, red and blue symbols correspond to **ADM70**-pDNA, **ADM105**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes, respectively.

Table 1 reports the results obtained for CDplexes formulated with **ADM70**, **ADM105** or **PBO234** and either ctDNA or pDNA. With these  $(m_{CD}/m_{DNA})_{\phi}$  values and following the procedure above explained, the effective charges of both the Janus CD based cationic vectors and the pDNA herein used,  $q_{eff,CD}^{+}$  and  $q_{eff,pDNA}^{-}$ , were calculated and collected in Table 2. The differences encountered between nominal and effective charges in both the cationic vectors and the anionic pDNA are remarkable. Thus, the net positive charges available for interaction with pDNA are around 33% of the nominal one, assuming full protonation of the amino groups, for the tetradecaamine derivatives **ADM70** and **ADM105**, and only 25% for heptamine **PBO234**. This scenario is similar to that found for some CD polyrotaxane-based vectors [12] but sharply different from that encountered for cationic lipid gene vectors bearing quaternary amino groups, which normally yield their total nominal positive charges within a range of 10 % of uncertainty [19,51,57]. On the other hand, the plasmid used

herein seems to be quite supercoiled at the experimental conditions used, since its available negative charge per bp is far away from the nominal value ( $-2/\text{bp}$ ), yielding around 7%, 13% and 5% of its nominal charge when being compacted by **ADM70**, **ADM105** and **PBO234**, respectively. This behaviour, often found in lipoplexes, confirms that plasmids usually retain an important percentage of cationic sodium counter-ions ( $\text{Na}^+$ ). This is *a priori* a favourable feature for the use of these macrocyclic vectors as safer and effective vehicles of nucleic acids, since the weaker the anionic character of the DNA, the lower the amount of cationic vector needed to formulate the nanocomplexes, thus decreasing the risk of cytotoxicity of the vector. From the paCD and pDNA effective charges thus obtained, effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ) around 5-fold (for **ADM70** and **PBO234**) or 2- to 3-fold (for **ADM105**) of the nominal ones were calculated using Eq. (2).

**Table 1.** Values of isoneutrality ratios  $(m_{\text{CD}}/m_{\text{DNA}})_{\phi}$  for the CDplexes formed by **ADM70**, **ADM105** and **PBO234** with either ctDNA or pDNA.

	<b>ADM70-DNA</b>	<b>ADM105-DNA</b>	<b>PBO234-DNA</b>
ctDNA	3.0	2.9	5.7
pDNA	0.19	0.38	0.25

Values estimated with a 5% error

**Table 2.** Nominal and effective charges of paCDs and pDNA.

	<b>ADM70</b>	<b>ADM105</b>	<b>PBO234</b>
$q_{nom,CD}^+$	14	14	7
$q_{eff,CD}^+$	4.6	4.7	1.7
$q_{eff,CD}^+ / q_{nom,CD}^+$	0.33	0.33	0.25
$q_{nom,pDNA}^- / bp$	-2	-2	-2
$q_{eff,pDNA}^- / bp$	-0.13	-0.26	-0.09
$q_{eff,pDNA}^- / q_{nom,pDNA}^-$	0.07	0.13	0.05
$\rho_{eff} / \rho_{nom}$	5.1	2.6	5.4

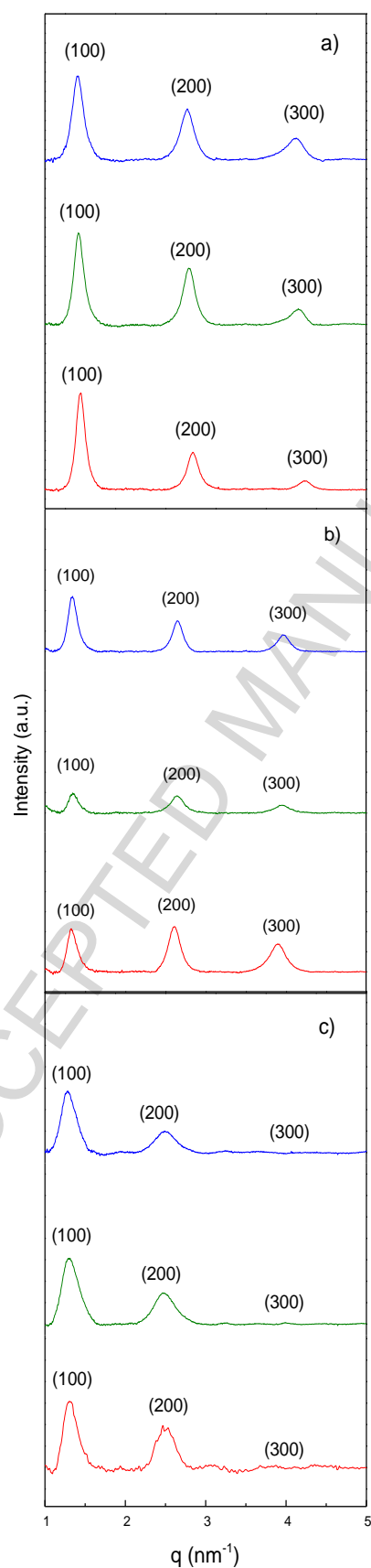
Values estimated with an 8% error

Having information of the structure of the complex is important to find the best non-viral vectors and to promote its use in *in vivo* gene therapy. The structure of the paCD-pDNA CDplexes in concentrated samples was investigated by SAXS at several effective charge ratios for which CDplexes are potentially active as gene transfection vectors ( $\rho_{eff} > 1$ ). Cryo-TEM was also used as a supporting technique. Fig. 3 shows the corresponding SAXS diffractograms (Intensity vs  $q$  factor) at  $\rho_{eff} = 2, 4$  and 8, with the Miller indexes being included in the plot. In all the cases, three peaks that index well to a lamellar lyotropic liquid crystal phase ( $L_\alpha$ ) were observed, regardless of  $\rho_{eff}$ , with the characteristic inter-layer distance ( $d$ ) directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi n/q_{hkl}$ ,  $n$  is the diffraction order). This structure may be explained by considering that the hexanoyl chains linked to the wider entrance of the  $\beta$ -CD torus promote self-assembling in a lipidic bilayer fashion, CDplexes being adequately represented as alternating bilayers of

paCDs molecules and an aqueous monolayer containing supercoiled pDNA, with thicknesses represented by  $d_m$ , and  $d_w$ , respectively, being  $d = d_m + d_w$ .

Table 3 collects the values of  $d$ , calculated as an average of the data obtained from the more intense peaks (100 and 200) of the diffractograms at each  $\rho_{eff}$  ratio. It is noticeable that the periodicity of the structure remains basically unaltered for a constant pDNA content when the proportion of the vector increases (i.e.  $d$  remains basically constant with  $\rho_{eff}$ ), for the three CDplexes studied. Considering these  $d$  values and the fact that pDNA supercoils needs around  $d_w \sim 2.0\text{-}2.5$  nm to be sandwiched by paCDs bilayers in a typical sandwich fashion, it can be deduced that the thickness of the bilayer ( $d_m$ ) must be  $\sim 3.1$ ,  $3.4$  and  $2.5$  nm for **ADM70**-pDNA, **ADM105**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes, respectively. Given the lengths of both the cationic tails and the lipid type chains, and the depth of the  $\beta$ -CD torus-shaped cavity, these  $d$ ,  $d_m$  and  $d_w$  values are compatible with a  $L_\alpha$  structure only if: i) the cationic tails on the narrower entrance of the CD macrocycle are somehow in an open bouquet fashion (to avoid electrostatic repulsions among positive charges) and/or ii) the lipidic type chains that are linked to the wider entrance of  $\beta$ -CD macrocycle are intercrossed.





**Fig. 3.** SAXS diffractograms of paCD-pDNA CDplexes at several effective charge ratios ( $\rho_{eff}$ ): Red lines  $\rho_{eff} = 2$ , green lines  $\rho_{eff} = 4$ , and blue lines  $\rho_{eff} = 8$  for: a) **ADM70**-pDNA; b) **ADM105**-pDNA; and c) **PBO234**-pDNA CDplexes.

**Table 3.** Values of  $q$  and  $d$  of the lamellar ( $L_\alpha$ ) liquid crystal phase found for the paCD-pDNA CDplexes (where paCDs are ADM70, ADM105 and PBO234), at several effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ).

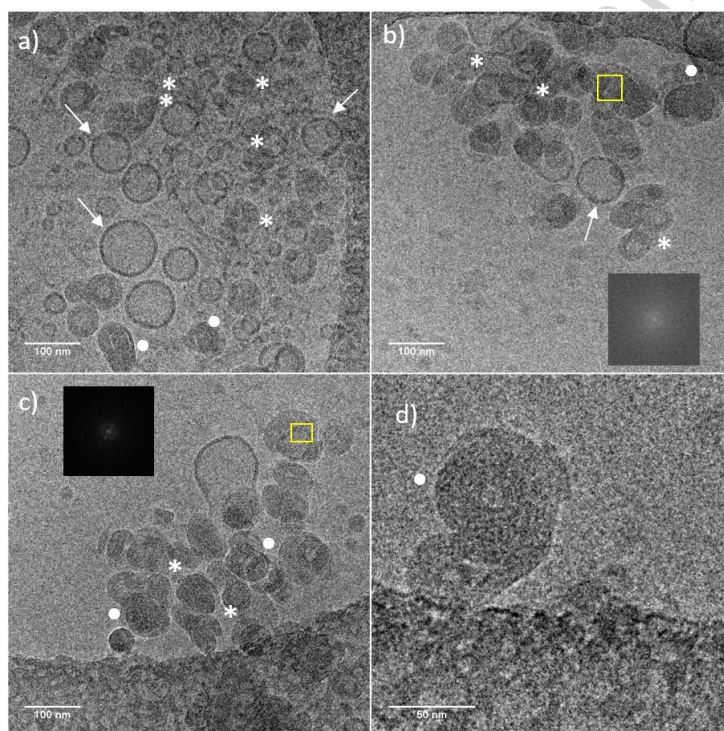
		ADM70	ADM105	PBO234
$\rho_{\text{eff}}$		$L_\alpha$	$L_\alpha$	$L_\alpha$
2	$q_{100}$	1.12	1.06	1.28
	$q_{200}$	2.21	2.09	2.50
	$q_{300}$	3.30	3.12	-
	$d$	5.6	5.9	5.0
4	$q_{100}$	1.13	1.09	1.31
	$q_{200}$	2.23	2.13	2.47
	$q_{300}$	3.33	3.16	-
	$d$	5.6	5.8	5.0
8	$q_{100}$	1.15	1.07	1.30
	$q_{200}$	2.27	2.12	2.50
	$q_{300}$	3.39	3.18	-
	$d$	5.5	5.9	4.9

Values of  $q$  and  $d$  are reported in  $\text{nm}^{-1}$  and nm, respectively.

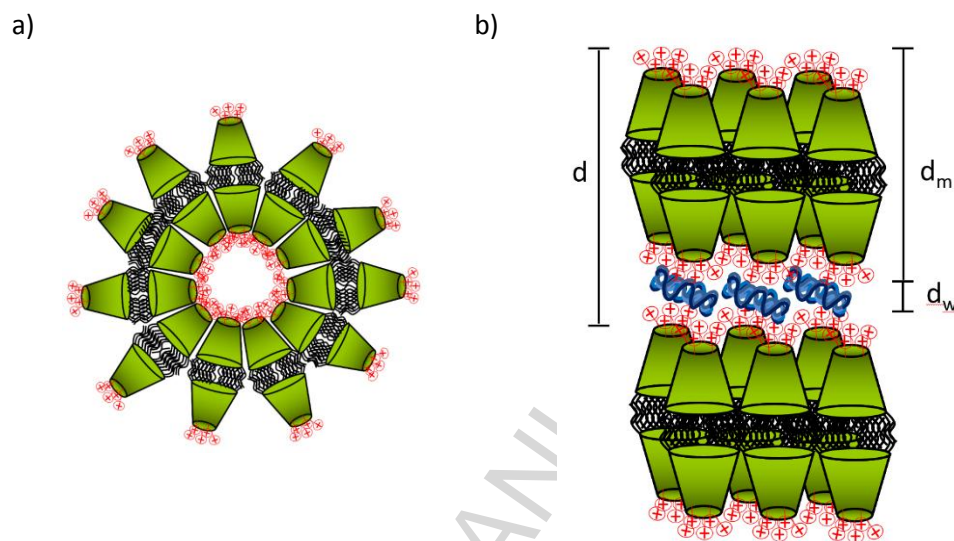
Cryo-TEM experiments further confirmed the multilamellar character of the CDplexes studied in this work. Fig. 4 shows a selection of micrographs among those taken for **ADM105**-pDNA CDplex that are representative of the ensemble of data (see Fig. S1 in Supplementary data for a selection of micrographs of **ADM70**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes). The multilamellar arrangement found in SAXS is also seen in these micrographs. In fact, three types of nanostructures in coexistence are found: (i)

CDplexes with a well-defined multilamellar profile and aggregated in a cluster type fashion (CT-type nanoaggregates; labelled with white asterisks in Fig. 4); (ii) CDplexes with a clear finger-print multilamellar pattern (FP-type nanoaggregates; labelled with white circles, and a zoom view in panel d), and; (iii) self-aggregated paCDs without pDNA compacted (labelled with white arrows), with a typical vesicle-type structure. The presence of aggregates of paCD molecules, without pDNA being compacted, is justified by the fact that the experiment is done for samples with a clear excess of cationic vector (notice that  $\rho_{eff} = 4$  in cryo-TEM experiments). These exceeding paCD molecules tend to form unilamellar spherical vesicle-type nanostructures, the formation of the lipidic bilayer being promoted by the presence of 14 lipidic type chains linked to the wider entrance of each cyclodextrin torus (2 chains per glucose unit). It can be inferred that the unilamellar paCD vesicles above mentioned interact with pDNA through strong electrostatic interactions and tend to aggregate yielding the multilamellar phases, either CT or FP, by sandwiching the plasmid supercoils within the aqueous monolayer that remain between each two bilayers. Scheme 2 shows schematic drawings of both nanoaggregates: (a) unilamellar vesicles in the absence of pDNA, and (b) multilamellar complexes in the presence of pDNA. In the CT-type structures, the bilayers may be deformed when sandwiching pDNA supercoils with the adjacent bilayers, but they essentially keep their morphologies. However, FP-type nanoaggregates show the typical finger-print compaction pattern, and in contrast with the CT-type CDplexes, the bilayers tend to disrupt probably due to a more favourable paCD-pDNA interaction. This particular scenario has been also previously found for different lipoplexes (cationic lipids-pDNA complexes) [20,57]. Some of the multilamellar arrangements shown in these micrographs (and other not shown) have been chosen to analyze the presence of periodicity. As representative examples, the

insets of panels b) and c) in Fig. 4, show Fast Fourier Transform (FFT) profiles where the diffraction spot corresponds to a typical lamellar pattern.



**Fig. 4.** A selection of cryo-TEM micrographs showing a general view of the **ADM105**-pDNA CDplexes at  $\rho_{eff} = 4$ . Insets on panels b) and c) show the diffraction spots from FFT calculations over a selected area on the original micrograph (yellow square). FFT pattern reveals a multilamellar structure. Scale bars are 100 nm in panels a-c and 50 nm in panel d.



**Scheme 2.** Schematic drawings of: a) Vesicles-type paCD self-aggregation pattern; and b) Multilamellar lyotropic liquid crystal phase ( $L_\alpha$ ) of the CDplexes studied in this work, showing the structural parameters,  $d$ ,  $d_m$  and  $d_w$ .

Accordingly, the ensemble of electrochemical and structural results shows  $L_\alpha$  self-assembling patterns irrespectively of  $\rho_{eff}$  values, while the best compaction levels are obtained at  $\rho_{eff} = 4$ . Additionally, it is known that CDplexes must be positively charged ( $\rho_{eff} > 1$ ), but with cationic vector content being as low as possible to diminish cytotoxicity. All these considerations point to  $\rho_{eff} = 4$  as a potentially adequate charge ratio to carry on both the proteomic and TE studies.

Upon in contact with biological milieu, CDplexes will adsorb plasma proteins in a time-dependent manner. Most abundant proteins will bind to vector surface first and will be progressively substituted by proteins with high affinity for the surface of CDplexes. At the equilibrium (typically reached within 1 h exposure), the PC of CDplexes will be constituted by a longstanding protein layer referred to as the *hard*

*corona* (HC), which will provide CDplexes with their biological identity, plus a *soft corona* (SC) made of proteins in dynamical exchange with the surrounding environment. In the present investigation, both paCDs and CDplexes were let to interact with HP for 1 h. The PC formation was confirmed by means of  $\zeta$ -potential and size measurements of the CDplexes in the absence and in the presence of HP. The data collected in Table 4 indicate that the bare complexes are positively charged ( $\zeta$ -potential around +30 mV), with mean hydrodynamic diameters of around 114 nm in the case of ADM70-pDNA CDplexes and around 150 nm for the other two CDplexes. After 1 h incubation with HP, a clear increase on the size of the complexes (hydrodynamic diameter increases around 40-45 nm in the three cases), and a marked drop in  $\zeta$ -potential, shifting from positive to negative (from ca. +30 mV to ca. -17 mV), were observed. These evidences are clearly compatible with the formation of a ca. 20-nm-thick PC, mostly consisting of negatively charged proteins (i.e.  $pI < 7$ ), that are located at the CDplex surface. It is also remarkable that **ADM70-pDNA** formulations, either in the absence or in the presence of HP, exhibited higher stability and homogeneity in size (in view of PDI values) as compared to **ADM105** and **PBO234** formulations.

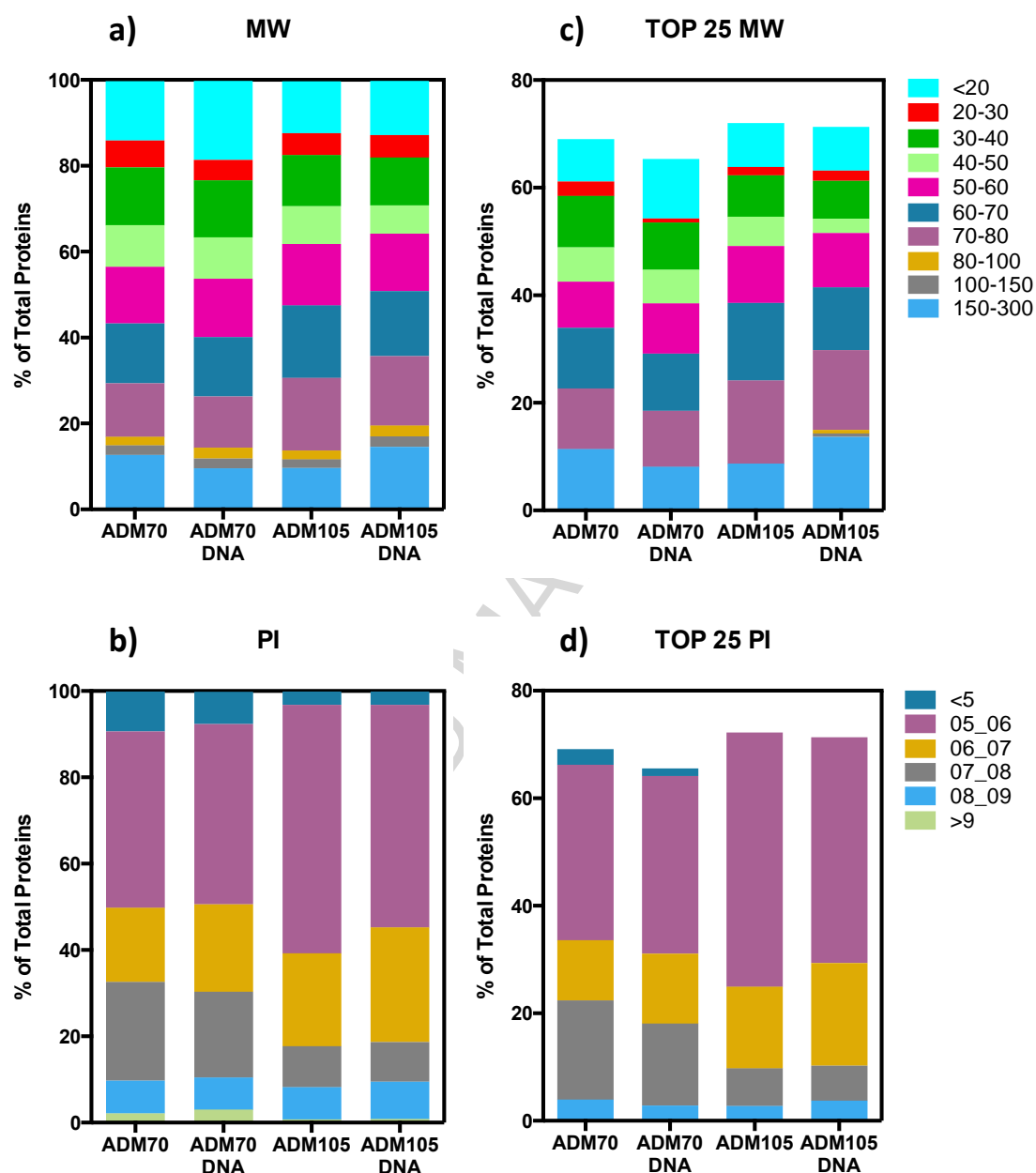
**Table 4.** Hydrodynamic diameter ( $D_h$ ), polydispersity index ( $PdI$ ) and  $\zeta$ -potential values of ADM70-pDNA, ADM105-pDNA and PBO234-pDNA CDplexes formulated at  $\rho_{eff} = 4$  before and after exposure to HP for 1h.

	$D_h$ (nm)	$PdI$	$\zeta$ -potential (mV)
<b>ADM70</b> -pDNA	$114 \pm 6$	$0.21 \pm 0.01$	$29.8 \pm 1.2$
<b>ADM70</b> -pDNA + HP	$153 \pm 8$	$0.34 \pm 0.03$	$-17.4 \pm 2.5$
<b>ADM105</b> -pDNA	$149 \pm 15$	$0.41 \pm 0.08$	$31.7 \pm 2.2$
<b>ADM105</b> -pDNA+HP	$191 \pm 18$	$0.64 \pm 0.13$	$-16.3 \pm 2.5$
<b>PBO234</b> -pDNA	$155 \pm 12$	$0.53 \pm 0.09$	$28.4 \pm 1.4$
<b>PBO234</b> -pDNA+ HP	$203 \pm 28$	$0.66 \pm 0.16$	$-18 \pm 7$

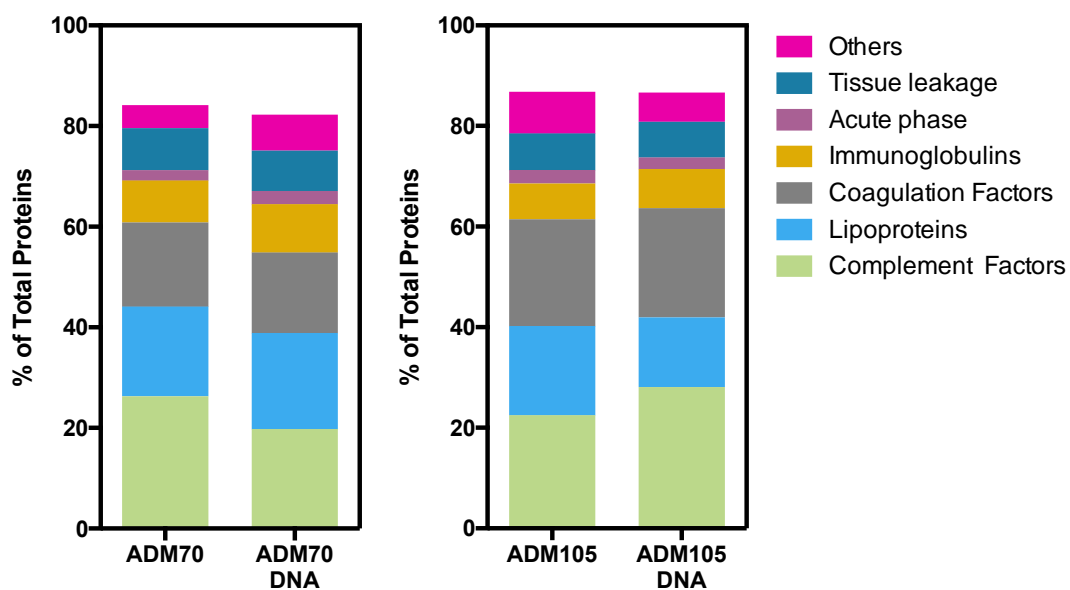
NanoLC-MS/MS experiments were run with the aim of identifying the corona proteins of the Janus paCD-pDNA formulations herein studied upon incubation with HP. In the case of **PBO234** and **PBO234**-pDNA CDplexes, incubation with HP did produce a tightly bound PC that could not be solubilized within the concentration range according to the standard protocols, preventing any further analysis. For **ADM70** and **ADM105** formulations, the relative protein abundance (RPA) of all the identified corona proteins was determined. Tables S1 and S2 report the top 25 most abundant proteins found within the corona of **ADM70** and **ADM105**, respectively (in the absence and presence of pDNA). All the proteins constituting the corona and these top 25 most abundant ones are classified by their molecular mass (MW) and their isoelectrical point (pI) in Fig. 5. In the absence of pDNA, **ADM70** PC is formed mostly by proteins with

molecular weight between 60-80 kDa (RPA~23%) and 150-300 kDa (RPA~11%). In the PC of **ADM70**-pDNA CDplex, proteins between 60-80 kDa remains roughly the same (RPA~21%), while a slight decrease in high MW proteins (150-300 kDa, RPA from 11 to 8%) and an increase in those under 20 kDa (RPA from 7 to 11%) was observed. Experiments for **ADM105** show that proteins with a molecular weight between 60-80 kDa have RPA~28%, irrespective of the absence or presence of pDNA, while the RPA for proteins with MW 150-300 kDa increases from ~8% for **ADM105** to 14% for **ADM105**-pDNA CDplexes. For both cyclodextrin-based vectors, with and without pDNA, the corona is made up of proteins with a pI between 5 and 6 (33% for **ADM70** and 44% for **ADM105**), meaning that the adsorbed proteins have mostly a negative charge ( $pI < 7$ ), in total agreement with the zeta potential results above commented. These results are in concordance with the idea that electrostatic intermolecular forces drive the non-covalent interaction between proteins and the cationic vectors.





**Fig. 5.** Percentage of total proteins of corona proteins of **ADM70** and **ADM105** in the absence and presence of pDNA, classified according to their calculated molecular mass, *MW* (a), and isoelectric point, *pI* (b). Percentage of total proteins of the top 25 corona proteins classified according to their calculated molecular mass, *MW* (c) and isoelectric point, *pI* (d). Percentage of total proteins was calculated as explained in the experimental section.



**Fig. 6.** Percentage of the proteins found within the protein corona (PC) of **ADM70** and **ADM105**, in the absence and presence of pDNA, classified by their physiological functions.

Corona proteins are also classified by their physiological functions (Fig. 6). For **ADM70** and **ADM105** nanoaggregates and for the corresponding CDplexes, complement, lipoprotein and coagulation were found to be the most abundant proteins, whereas immunoglobulins, tissue leakage and acute phase proteins constituted a minor fraction of the PC. Complement proteins promote elimination from systemic circulation, accumulation in the liver, spleen and clearance, and they are involved in immune response. Coagulation proteins are involved in coagulation processes, whereas lipoproteins affect the intracellular trafficking. Figs. S2 and S3 report a bioinformatic classification of corona proteins, in terms of percentage of total proteins identified for each functional class. As can be inferred from those plots, prothrombin presents the highest percentage for both paCDs in the absence of pDNA, followed by C4BPA, vitronectin, albumin and APOA1. In the case of the CDplexes, the trend is very similar, although the abundance of albumin is more affected by the type of paCD and/or the

absence/presence of pDNA. It is worthwhile mentioning that prothrombin is involved in coagulation process, C4BPA controls the activation of complement classical pathway, vitronectin is a receptor for cancer cells, albumin promotes prolonged blood circulation and crossing biological barriers, while APOA1 is the major protein of high density lipoproteins (HDL) and can be used as a ligand.

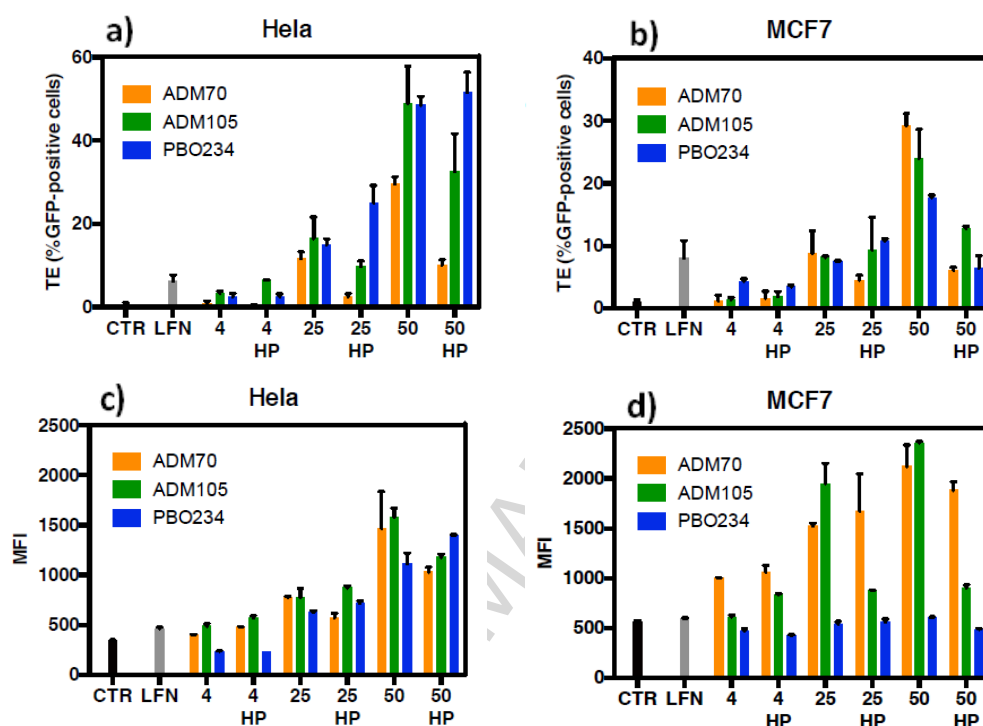
Lastly, transfection efficiency (TE) and cell viability of Janus paCD-based CDplexes have been evaluated in HeLa and MCF-7 cancer cells at  $\rho_{eff} = 4$  in the absence and presence of Human Plasma (HP). Lipofectamine was used as a positive control. In Fig. 7, TE results are reported in terms of % GFP expressed (panels a-b) and mean fluorescence intensity (MFI) (panels c-d). High values of % GFP indicate that there is a significant percentage of cell population expressing GFP protein, while a high MFI value points to a high level of GFP protein expression per cell that results from the number of copies of pDNA transfected, transcribed and translated per cell. Efficient transfection reagents often suffer, nonetheless, from high cytotoxicity. To evaluate whether or not Janus paCD formulations were toxic, HeLa and MCF-7 cancer cells were treated with the corresponding CDplexes and then subjected to MTT analysis, whose results are resumed in Fig. 8. Notably, Fig. 7 shows that CDplexes formulated at  $\rho_{eff} = 4$  transfect the cells roughly as poorly efficiently as the control, in terms of MFI, or slightly worst, in what respect to %GFP. Nonetheless, cell viability outputs were reasonably good (70 - 100%) at this  $\rho_{eff}$ , both in absence and in presence of HP (Fig. 8).

In an attempt to overcome such poor TE results, two strategies were designed: i) we increased the concentration of CDplexes/cell, but keeping  $\rho_{eff} = 4$ , since recent results [58] point to this increase as a favorable factor to improve TE performances; and/or ii) we increased  $\rho_{eff}$ , with the risk of increasing cytotoxicity levels as well. Fig. S4 shows the results obtained working with the first approach. As can be seen, increasing the

CDplexes concentration per cell (2X, 5X and even 10X) yield transfection efficiencies even lower than those previously obtained (1X), in contrast with the standard Lipofectamine for which an increase in the CDplexes doses provokes a clear improvement on TE results for HeLa cells. Furthermore, cytotoxicity levels show a slight increase when CDplexes/cell concentration is raised for both the samples and the control. This non desirable combination (decrease on TE and increase on cytotoxicity) clearly reveals that the first strategy must be discarded for the CDplexes herein reported.

Fig. 7 shows the results obtained with the second approach, i.e. increasing  $\rho_{eff}$  up to 25 and 50, together with those corresponding to  $\rho_{eff} = 4$ , previously commented. As can be seen, the three paCDs were more efficient transfecting pDNA than Lipofectamine (better %GFP and MFI values) at these higher  $\rho_{eff}$ , both in the absence and in the presence of HP. In the absence of HP and at high  $\rho_{eff}$ , MFI results (Fig. 7 c-d) followed the trend **ADM70**-pDNA  $\approx$  **ADM105**-pDNA > **PBO234**-pDNA, irrespective of the cell line, although the superiority of **ADMs** were more evident in MCF-7 cells. However, certain reduction in transfection efficiency promoted by the presence of HP was found, a feature that could be due to a reduced endosomal escape in the cytoplasm of cells. Indeed, while HP can promote interaction with cell receptors, fusion with endosomal membranes could be, at least in part, impaired by the rich protein layer adsorbed at the surface of the vector. Nonetheless, some proteins forming the corona could shuttle the complex to acid cell compartments (e.g. lysosomes) where the gene payload could be degraded. In spite of the reduction on TE outcomes provoked by the presence of HP, CDplexes consisting of **ADMs**, and in particular PC-coated **ADM70**-pDNA CDplexes, produced again better MFI values (primarily for MCF-7 cells), suggesting that, although the PC is probably detrimental for cell uptake, the intracellular steps leading

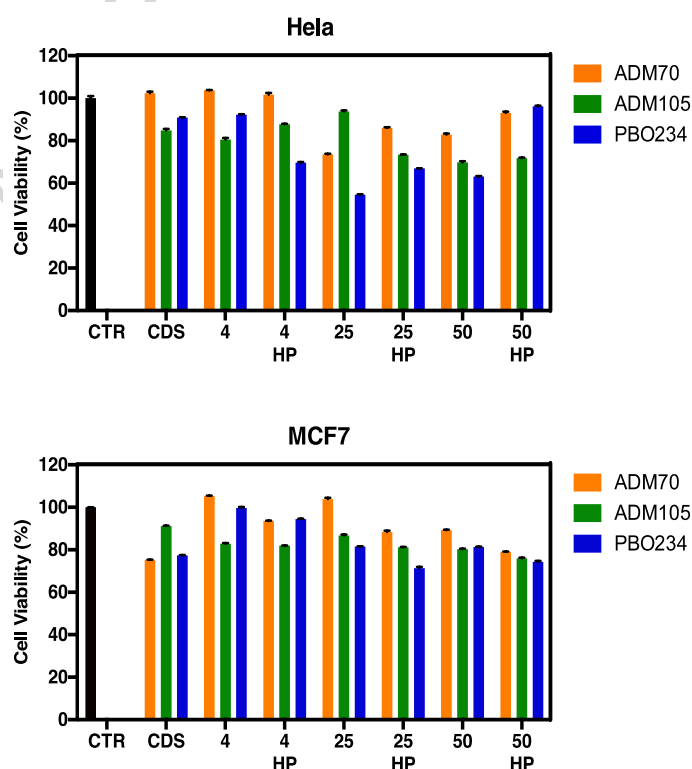
to protein expression, including endosome escape, trafficking to the nucleus and pDNA release, are particularly favorable for PC-coated ADM70-pDNA CDplexes.



**Fig.7.** Transfection efficiency (TE) values of paCDs-pDNA CDplexes, in terms of % GFP expressed (panels a-b) and mean fluorescence intensity (MFI) (panels c-d), at  $\rho_{eff} = 4, 25$  and  $50$ , in the absence and presence of Human Plasma (HP), through HeLa and MCF-7 cells. CTR: cells alone. LFN: Lipofectamine, positive control.

On the other hand, as shown in Fig. 8, the increase on effective charge ratio ( $\rho_{eff}$ ) from 4 to 50 seems to slightly decrease the viability of HeLa cells, in the absence of HP, while no appreciable decrease is observed in MCF-7 cells. In the presence of PC, cell viability of both cell lines was not appreciably diminished. Notice, nonetheless, that

almost all the values are around or over 80%, which is considered a minimum threshold value. However, interpretation of the effect of PC on the cell viability of CDplexes must be done with caution. Whether PC reduce cell viability or protect the cells can be due to specific PC composition and, in turn, to the complex relationship between PC composition and nanocarrier processing by cell machinery [59]. Moreover, in the absence of *in vivo* experiments, the evaluation of PC composition, although implies an important improvement with respect to the use of SDS PAGE experiments alone, does not allow one to depict strong conclusions about future *in vivo* applications (i.e. targeting ability, bio-distribution, cytotoxicity). In fact, in the literature, major works are discussing about mapping protein binding sites across the PC surface. In the absence of this piece of information, discussion about the potential role of corona proteins should be made, but kept at a minimum, as done in this work. Otherwise, the risk of speculation may be too high.



**Fig. 8.** Cell viability of paCDS-pDNA CDplexes at  $\rho_{eff} = 4, 25$  and  $50$  for HeLa and MCF-7 cells, in the absence and presence of human plasma (HP). CTR: cells alone. CDS: cells in the presence of paCDS without pDNA.

The above presented experimental evidences support that the Janus paCD structures ADM70 and ADM105 are promising nonviral vectors for pDNA delivery, overall superior to PBO234 and to the Lipofectamine control. Differences in transfection efficiency as a function of the cell line might arise from differences in the preferred internalization routes. Thus, it has been reported that CDplexes can enter the cell by caveolae- and clathrin-mediated endocytosis, but only the first mechanism is productive regarding protein expression [30]. Moreover, CDplexes obtained from **ADM70** seem to exhibit the most favourable features for *in vitro* gene therapy applications: high stability in the absence or presence of HP, homogeneous size distribution, lower impact (with respect to the other two paCDs) of the PC in the capacity of the CDplexes to efficiently mediate protein expression *in cellulo*, and very low cytotoxicity even at high  $\rho_{eff}$  values, and independently of the presence or not of HP. These features are in agreement with the previously observed superiority of **ADM70** formulations in *in vivo* transfection studies [33,34]. The body of biophysical and biochemical evidences obtained in this work provides a pathway for the rigorous characterization of pDNA-molecular vector formulations in view of their optimization for gene therapy applications. Broadening the current database on vector structures, electrochemical and structural properties of their aggregates, protein corona composition and transfection efficiencies in different *in vitro* and *in vivo* experimental settings should fund the basis for the rational design of

second generation candidates. Work in that direction is currently sought in our laboratories.

#### 4. Conclusions

This work was aimed to provide new insights in the fascinating processes governing pDNA complexation by monodisperse vectors of the Janus paCD family, in an attempt to delineate the mechanisms whereby differences in molecular structure translates into differences in transfection capabilities. For that purpose, three Janus CD-based compounds (**ADM70**, **ADM105** and **PBO234**) have been thoroughly checked as potential nanocarriers of a pEGFP-C3 plasmid that codes for GFP expression to the interior of HeLa and MCF-7 cancer cells, both in the absence and presence of human serum. In a first level of organization, the vector molecular structure influences the effective positive charge available for interacting with the plasmid as well as the effective negative charge of the plasmid in the nanoaggregates. In fact, zeta potential study revealed that effective charges are lower than nominal ones both for the CD-based vectors (around 30% for ADMs and 25% for PBO234), and also for the pDNA, which renders a low percentage of its negative charge (less than 15%) when it is compacted by the nanocarriers. This is a potentially favourable finding since the weaker the anionic character of the DNA, the lower the amount of cationic vector needed to formulate the nanocomplexes, thus decreasing the cytotoxicity of the vector and increasing their potential output as safe and effective vehicles of nucleic acids. On the other hand, SAXS and cryo-TEM studies have shown that **ADM70**-pDNA, **ADM105**-pDNA and **PBO234**-pDNA CDplexes are structured according to a multilamellar lyotropic liquid crystal phase ( $L_\alpha$ ). Two different multilamellar phases are distinguished, nonetheless, on cryo-TEM micrographs (CT-type and FP-type



nanoaggregates), in coexistence with unilamellar vesicles of self-aggregated exceeding paCDs without pDNA compacted. Although the Janus feature seems to warrant a multilamellar arrangement for the paCD-pDNA nanocomplexes in all cases, their stability and homogeneity can be significantly different depending on the topology of the multivalent cationizable domain in the paCD entity. In the presence of human plasma, a second level of organization takes place involving the interaction with serum proteins, giving rise to multicomponent nanoassemblies equipped with a protein corona whose composition varies from a paCD formulation to another. The protein corona (PC) characterization has also driven to interesting conclusions. The adsorbed proteins have mostly a negative charge in all the cases ( $pI < 7$ ), pointing to the electrostatic interactions as the driven non-covalent forces between proteins and the cationic vectors. Complement, lipoprotein and coagulation were found to be the most abundant types of proteins within the corona of the Janus paCDs and the corresponding CDplexes, whereas immunoglobulins, tissue leakage and acute phase proteins constituted a minor fraction of the PC. At moderate-to-high charge ratios ( $\rho_{eff} = 25$  and  $50$ ), the bare CDplexes herein reported seem to transfect either HeLa or MCF-7 cancer cells more efficiently than Lipofectamine, and with high cell viabilities ranged from 80 to 100%. These transfection efficiencies were found to slightly decrease in the presence of biological media (HP), but in any case the values found were higher than those obtained with the control Lipofectamine. However, the effect of PC on the cell viability of CDplexes is not that easy to interpret. Probably, the specific PC composition and, in turn, its complex effect on nanocarrier processing by cell machinery, play a crucial role, although an accurate mapping of protein binding sites in the PC would be necessary to go further in these conclusions. In any case, the whole body of both biophysical and biochemical evidences obtained in this work allow us to conclude that the three paCDs

proposed can be considered as potentially efficient nanocarriers *in vitro* and promising gene vectors for *in vivo* applications. Going further, among the three Janus paCDS nanovectors checked in this work, **ADM70** seem to exhibit the most favourable features for *in vitro* gene therapy applications requiring serum-containing media, in total agreement with the already observed superiority of **ADM70** formulations in *in vivo* transfection studies.

## Acknowledgments

MINECO of Spain, (contract numbers CTQ2012-30821, SAF2013-44021-R and CTQ2015-64425-C2-1-R), the Junta de Andalucía (contract number FQM2012-1467), University Complutense of Madrid (Spain) (project no. UCMA05-33-010) and the European Regional Development Funds (FEDER and FSE) for financial support. SAXS experiments were performed at NCD11 beamline at ALBA Synchrotron Light Facility with the collaboration of ALBA staff. Authors also thank C. Aicart-Ramos for carrying on amplification of plasmid DNA at the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (UCM, Spain) and also P. Castro-Hartmann, Servei de Microscopia of UAB (Spain), for cryo-TEM experiments.

## Appendix A: Supplementary data

Supplementary Information available: Additional cryo-TEM micrographs, details and tables of the top 25 most abundant proteins in the protein corona of the CDplexes, and additional TE and cell viability experiments at higher CDplexes concentrations per cell. This information can be found on line at <http://dx.doi.org/>

## References

- [1] E. Junquera, E. Aicart, Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 233 (2016) 161-175.
- [2] I.M. Verma, M.D. Weitzman, Gene therapy: Twenty-first century medicine, *Annu. Rev. Biochem.*, 74 (2005) 711-738.
- [3] E. Junquera, E. Aicart, Cationic lipids as transfecting agents of DNA in gene therapy, *Curr. Topics Med. Chem.*, 14 (2014) 649-663.
- [4] T. Montier, T. Benvegnu, P.A. Jaffres, J.J. Yaouanc, P. Lehn, Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: A series of bio-inspired lipids as an example, *Curr. Gene Ther.*, 8 (2008) 296-312.
- [5] R.S. Dias, B. Lindman, *DNA Interaction with Polymers and Surfactants*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008.
- [6] K. Ewert, N.L. Slack, A. Ahmad, H.M. Evans, A.J. Lin, C.E. Samuel, C.R. Safinya, Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: Understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level, *Curr. Med. Chem.*, 11 (2004) 133-149.
- [7] P.P. Karmali, A. Chaudhuri, Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises, *Med. Res. Rev.*, 27 (2007) 696-722.
- [8] A.J. Kirby, P. Camilleri, J. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L.G. Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk, Gemini surfactants: New synthetic vectors for gene transfection, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42 (2003) 1448-1457.

- [9] P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N.K. Jain, A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA, *Biomaterials*, 33 (2012) 7138-7150.
- [10] B. Khurana, A.K. Goyal, A. Budhiraja, D. Arora, S.P. Vyas, siRNA delivery using nanocarriers - An efficient tool for gene silencing, *Curr. Gene Ther.*, 10 (2010) 139-155.
- [11] M.A. Islam, T.E. Park, B. Singh, S. Maharjan, J. Firdous, M.H. Cho, S.K. Kang, C.H. Yun, Y.J. Choi, C.S. Cho, Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA, *J. Controlled Release*, 193 (2014) 74-89.
- [12] V.D. Badwaik, E. Aicart, Y.A. Mondjinou, M.A. Johnson, V.D. Bowman, D.H. Thompson, Structure-property relationship for in vitro siRNA delivery performance of cationic 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: PEG-PPG-PEG polyrotaxane vectors, *Biomaterials*, 84 (2016) 86-98.
- [13] W. Kusser, Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *Rev. Molec. Biotechnol.*, 74 (2000) 27-38.
- [14] B.E. Eaton, The joys of in vitro selection: chemically dressing oligonucleotides to satiate protein targets, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1 (1997) 10-16.
- [15] I.S. Blagbrough, A.A. Metwally, siRNA and Gene Formulation for Efficient Gene Therapy, InTech, 2013.
- [16] C.E. Thomas, A. Ehrhardt, M.A. Kay, Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy, *Nature Rev. Gen.*, 4 (2003) 346-358.
- [17] P.D. Robbins, S.C. Ghivizzani, Viral vectors for gene therapy, *Pharmacol Therapeut.*, 80 (1998) 35-47.
- [18] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.*, 109 (2008) 259-302.

- [19] K. Kumar, A.L. Barran-Berdon, S. Datta, M. Munoz-Ubeda, C. Aicart-Ramos, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, A delocalizable cationic headgroup together with an oligo-oxyethylene spacer in gemini cationic lipids improves their biological activity as vectors of plasmid DNA, *J. Mater. Chem. B*, 3 (2015) 1495-1506.
- [20] A.L. Barran-Berdon, S.K. Misra, S. Datta, M. Muñoz-Ubeda, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, Cationic gemini lipids containing polyoxyethylene spacers as improved transfecting agents of plasmid DNA in cancer cells, *J. Mater. Chem. B*, 2 (2014) 4640-4652.
- [21] D. Putnam, Polymers for gene delivery across length scales, *Nature Mater.*, 5 (2006) 439-451.
- [22] D.J. Bharali, I. Klejbor, E.K. Stachowiak, P. Dutta, I. Roy, N. Kaur, E.J. Bergey, P.N. Prasad, M.K. Stachowiak, Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain, *PNAS*, 102 (2005) 11539-11544.
- [23] C. Ortiz Mellet, J.M. Garcia Fernandez, J.M. Benito, Glycotransporters for gene delivery, in: A.P. Rauter, T.K. Lindhorst (Eds.) *Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches* vol. 38, 2012, pp. 338-375.
- [24] C. Ortiz Mellet, J.M. Benito, J.M. García Fernandez, Preorganized, macromolecular, gene-delivery systems, *Chem. Eur. J*, 16 (2010) 6728-6742.
- [25] Y. Aoyama, Macrocyclic glycoclusters: From amphiphiles through nanoparticles to glycoviruses, *Chem. Eur. J*, 10 (2004) 588-593.
- [26] V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, Arginine clustering on calix-4-arene macrocycles for improved cell penetration and DNA delivery, *Nature Commun.*, 4 (2013).

- [27] J.L. Jiménez Blanco, F. Ortega-Caballero, L. Blanco-Fernández, T. Carmona, G. Marcelo, M. Martínez-Negro, E. Aicart, E. Junquera, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernández, Trehalose-based Janus cyclooligosaccharides: the “click” synthesis and DNA-directed assembly into pH-sensitive transfectious nanoparticles., *Chem. Commun.*, 52 (2016) 10117-10120.
- [28] S. Loethen, J.M. Kim, D.H. Thompson, Biomedical applications of cyclodextrin based polyrotaxanes, *Polymer Reviews*, 47 (2007) 383-418.
- [29] C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernandez, J.M. Benito, Cyclodextrin-based gene delivery systems, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 1586-1608.
- [30] A. Diaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J.M. Benito, C. Ortiz Mellet, S.C. De Smedt, J.M. García Fernandez, Insights in cellular uptake mechanisms of pDNA-polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (CDplexes), *J. Controlled Release*, 143 (2010) 318-325.
- [31] A. McMahon, E. Gomez, R. Donohue, D. Forde, R. Darcy, C.M. O'Driscoll, Cyclodextrin gene vectors: cell trafficking and the influence of lipophilic chain length, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 18 (2008) 303-307.
- [32] G. Caracciolo, H. Amenitsch, Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes, *Eur. Biophys. J.*, 41 (2012) 815-829.
- [33] C. Aranda, K. Urbiola, A.M. Ardoy, J.M. García Fernandez, C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, Targeted gene delivery by new folate-polycationic amphiphilic cyclodextrin-DNA nanocomplexes in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 85 (2013) 390-397.
- [34] A. Mendez-Ardoy, K. Urbiola, C. Aranda, C. Ortiz Mellet, J.M. Garcia Fernandez, C. Tros de Ilarduya, Polycationic amphiphilic cyclodextrin-based nanoparticles for therapeutic gene delivery, *Nanomedicine*, 6 (2011) 1697-1707.

- [35] S.D. Wettig, R.E. Verrall, M. Foldvari, Gemini surfactants: A new family of building blocks for non-viral gene delivery systems, *Curr. Gene Ther.*, 8 (2008) 9-23.
- [36] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A.E. Rowan, M.C. Feiters, J. Engberts, Transfection mediated by gemini surfactants: Engineered escape from the endosomal compartment, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 1551-1558.
- [37] A.L. Barran-Berdon, D. Pozzi, G. Caracciolo, A.L. Capriotti, G. Caruso, C. Cavaliere, A. Riccioli, S. Palchetti, A. Lagana, Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: Relevance for targeted drug delivery, *Langmuir*, 29 (2013) 6485-6494.
- [38] D. Walczyk, F.B. Bombelli, M.P. Monopoli, I. Lynch, K.A. Dawson, What the cell “sees” in bionanoscience, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 5761-5768.
- [39] G. Caracciolo, F. Cardarelli, D. Pozzi, F. Salomone, G. Maccari, G. Bardi, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, M. Papi, A. Lagana, Selective targeting capability acquired with a protein corona adsorbed on the surface of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane/DNA nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5 (2013) 13171-13179.
- [40] G. Caracciolo, S. Palchetti, V. Colapicchioni, L. Digiacomo, D. Pozzi, A.L. Capriotti, G. La Barbera, A. Laganà, Stealth effect of biomolecular corona on nanoparticle uptake by immune cells, *Langmuir*, 31 (2015) 10764-10773.
- [41] M. Lundqvist, J. Stigler, T. Cedervall, T. Berggård, M.B. Flanagan, I. Lynch, G. Elia, K. Dawson, The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study, *ACS Nano*, 5 (2011) 7503-7509.

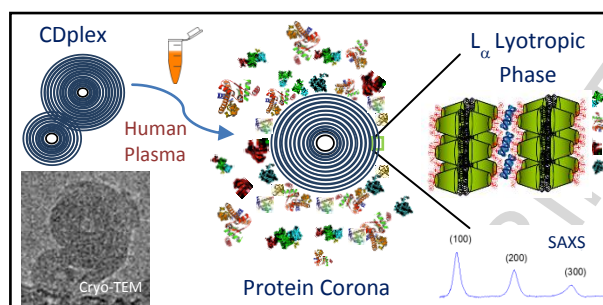
- [42] A.L. Capriotti, G. Caracciolo, C. Cavaliere, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi, A. Lagana, Do plasma proteins distinguish between liposomes of varying charge density?, *J. Proteomics*, 75 (2012) 1924-1932.
- [43] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60 (2008) 1615-1626.
- [44] V. Mirshafiee, M. Mahmoudi, K. Lou, J. Cheng, M.L. Kraft, Protein corona significantly reduces active targeting yield, *Chem. Commun.*, 49 (2013) 2557-2559.
- [45] H. Amenitsch, G. Caracciolo, P. Foglia, V. Fuscoletti, P. Giansanti, C. Marianecchi, D. Pozzi, A. Lagana, Existence of hybrid structures in cationic liposome/DNA complexes revealed by their interaction with plasma proteins, *Colloids Surf. B*, 82 (2011) 141-146.
- [46] A.L. Capriotti, G. Caracciolo, G. Caruso, P. Foglia, D. Pozzi, R. Samperi, A. Lagana, DNA affects the composition of lipoplex protein corona: A proteomics approach, *Proteomics*, 11 (2011) 3349-3358.
- [47] A. Diaz-Moscoso, L. Le Gourrierec, M. Gomez-Garcia, J.M. Benito, P. Balbuena, F. Ortega-Caballero, N. Guilloteau, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J.M. García Fernández, Polycationic amphiphilic cyclodextrins for gene delivery: synthesis and effect of structural modifications on plasmid DNA complex stability, cytotoxicity, and gene expression, *Chem. Eur. J.*, 15 (2009) 12871-12888.
- [48] A. Gadelle, J. Defaye, Selektive halogenierung von cyclomaltooligosacchariden in C6-position und synthese von Per (3, 6-anhydro) cyclomaltooligosacchariden, *Angew. Chem.*, 103 (1991) 94-95.
- [49] M. Gómez-García, J.M. Benito, D. Rodríguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutiérrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, J.M. García Fernández,



- Probing secondary carbohydrate-protein interactions with highly dense cyclodextrin-centered heteroglycoclusters: the heterocluster effect, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 7970-7971.
- [50] Y. Aoyama, T. Kanamori, T. Nakai, T. Sasaki, S. Horiuchi, S. Sando, T. Niidome, Artificial viruses and their application to gene delivery. Size-controlled gene coating with glycocluster nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 3455-3457.
- [51] S.K. Misra, M. Muñoz-Ubeda, S. Datta, A.L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, Effects of a delocalizable cation on the headgroup of gemini lipids on the lipoplex-type nano-aggregates directly formed from plasmid DNA, *Biomacromolecules*, 14 (2013) 3951-3963.
- [52] M. Muñoz-Ubeda, S.K. Misra, A.L. Barran-Berdon, S. Datta, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, How does the spacer length of cationic gemini lipids influence the lipoplex formation with plasmid DNA? Physicochemical and biochemical characterizations and their relevance in gene therapy, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 3926-3937.
- [53] M. Muñoz-Ubeda, S.K. Misra, A.L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, M.B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya, E. Aicart, Why is less cationic lipid required to prepare lipoplexes from plasmid DNA than linear DNA in gene therapy?, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 18014-18017.
- [54] J. Bednar, C.L. Woodcock, *Chromatin*, Academic Press Inc, San Diego, CA, 1999.
- [55] J. Dubochet, M. Adrian, J.J. Chang, J.C. Homo, J. Lepault, A.W. McDowell, P. Schultz, Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Q. Rev. Biophys.*, 21 (1988) 129-228.

- [56] J. Dubochet, B. Zuber, M. Eltsov, C. Bouchet-Marquis, A. Al-Amoudi, F. Livolant, How to "read" a vitreous section, in: *Methods Cell. Biol.*, vol. 79, 2007, pp. 385-406.
- [57] A.L. Barran-Berdon, M. Muñoz-Ubeda, C. Aicart-Ramos, L. Perez, M.R. Infante, P. Castro-Hartmann, A. Martin-Molina, E. Aicart, E. Junquera, Ribbon-type and cluster-type lipoplexes constituted by a chiral lysine based cationic gemini lipid and plasmid DNA, *Soft Matter*, 8 (2012) 7368-7380.
- [58] S. Palchetti, D. Pozzi, C. Marchini, A. Amici, C. Andreani, C. Bartolacci, L. Digiacomo, V. Gambini, F. Cardarelli, C. Di Rienzo, G. Peruzzi, H. Amenitsch, R. Palermo, I. Screpanti, G. Caracciolo, Manipulation of lipoplex concentration at the cell surface boosts transfection efficiency in hard-to-transfect cells, *Nanomed. Nanotechnol, Biol. Med.*, (2016) in press, DOI: 10.1016/j.nano.2016.1008.1019.
- [59] D. Maiolo, P. Del Pino, P. Metrangolo, W.J. Parak, F.B. Bombelli, Nanomedicine delivery: does protein corona route to the target or off road?, *Nanomedicine*, 10 (2015) 3231-3247.

## Graphical Abstract



### Highlights

- Effective charges (lower than nominal) potentially improve CDplexes transfection outputs.
- CDplexes show  $L_\alpha$  multilamellar patterns, quite appropriate to interact with cellular membranes.
- When exposed to human plasma CDplexes are covered by a rich protein corona.
- Optimized CDplexes exhibit high TE and very low cytotoxicity in HeLa and MCF7 cancer cells.
- TE/cell viability outputs of optimized CDplexes overcome those of the standard Lipofectamine.



Showcasing research from the groups of Profs. C. Ortiz Mellet, C. Tros de Ilarduya, F. Mendicuti, E. Junquera and J. M. García Fernández, Universities of Sevilla, Navarra, Alcalá, Complutense, and the CSIC (Institute of Chemical Research), Spain.

Trehalose-based Janus cyclooligosaccharides: the "Click" synthesis and DNA-directed assembly into pH-sensitive transfectious nanoparticles

The convergent synthesis of trehalose-based Janus cyclooligosaccharides with segregated cationic and lipophilic domains that in the presence of DNA undergo pH-dependent self-assembly into lamellar superstructures mediating transfection *in vitro* and *in vivo* is reported.

As featured in:



See J. L. Jiménez Blanco et al., *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 10117.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2016, 52, 10117

Received 8th June 2016,  
Accepted 30th June 2016

DOI: 10.1039/c6cc04791b

www.rsc.org/chemcomm

## Trehalose-based Janus cyclooligosaccharides: the “Click” synthesis and DNA-directed assembly into pH-sensitive transfectious nanoparticles†

J. L. Jiménez Blanco,<sup>\*a</sup> F. Ortega-Caballero,<sup>a</sup> L. Blanco-Fernández,<sup>b</sup> T. Carmona,<sup>c</sup> G. Marcelo,<sup>c</sup> M. Martínez-Negro,<sup>d</sup> E. Aicart,<sup>d</sup> E. Junquera,<sup>\*d</sup> F. Mendicuti,<sup>\*c</sup> C. Tros de Ilarduya,<sup>\*b</sup> C. Ortiz Mellet<sup>a</sup> and J. M. García Fernández<sup>\*e</sup>

**The convergent preparation of Janus molecular nanoparticles by thiourea-“clicking” of  $\alpha,\alpha'$ -trehalose halves has been implemented; the strategy allows access to macrocyclic derivatives with segregated cationic and lipophilic domains that in the presence of DNA undergo pH-dependent self-assembly into lamellar superstructures, as established by electrochemical, structural (SAXS), microscopical (TEM) and computational techniques, that mediate transfection *in vitro* and *in vivo*.**

The term “Janus” was initially adopted from Roman mythology by materials scientists to denote particles with a three-dimensionally dissymmetrical distribution of physical/chemical features.<sup>1</sup> Because of their morphological and chemical asymmetry, Janus particles can assemble into unique superstructures that cannot be obtained *via* the assembly of homogeneous particles.<sup>2</sup> The notion has been further extended to describe the entities exhibiting dichotomy in general, from covalent structures to supramolecular assemblies and nanocomposites. Among them, molecular Janus architectures are particularly interesting. Their decreased sizes of typically only a few nanometers and the possibility of precise chemical tailoring make them ideally suited for the incorporation of functional and structural hierarchy. However, most of the molecular Janus entities reported so far are based on dendritic<sup>3</sup> or polymeric scaffolds<sup>4</sup> with a high degree of conformational flexibility. Alternatively, connecting together hydrophobic and hydrophilic 3D molecular frameworks

with precisely defined chemical structures, sizes, shapes, symmetry and surface functional groups, referred to as “molecular nanoparticles” (MNPs), have been used to generate new monodisperse Janus-like topologies.<sup>5</sup> The examples on record include snowman or dumbbell-like nanostructures obtained from polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS), C<sub>60</sub> fullerene, polyoxometalate (POM), cyclodextrin (CD) or calixarene (CA) building blocks that still keep a relatively high degree of conformational flexibility and in which the spatial separation between the components fluctuates depending on the nature of the tether.<sup>6</sup> “Monomeric” Janus-like MNPs, better mimicking “hard” Janus objects, can be accessed by selective facial functionalization when the starting precursor exhibit intrinsic molecular anisotropy, as is the case for CD and CA platforms.<sup>7</sup> Recently, Chiara and coworkers<sup>8</sup> have reported an elegant strategy to break the symmetry and create a “perfect” Janus feature in a cubic POSS precursor by exploiting the geometrical complementarity of the cube face with a conveniently tetra-functionalized partner. In any case, with a few exceptions such divergent approaches require a multiple-step synthesis involving delicate control over reaction conditions and nontrivial purifications to warrant diastereochemical purity. Here we present an alternative convergent tactic based synthesis in the multipoint covalent assembly of dissimilar halves that allows elaborating “perfect” Janus cyclooligosaccharides made of  $\alpha,\alpha'$ -trehalose (cyclotrehalans, CTs) whose self-assembly behaviors are dictated by symmetry breaking in both functional groups and supramolecular interactions. The methodology has been applied to the efficient synthesis of MNPs which is capable of reversibly condensing DNA into self-assembled lamellar nanocomplexes (CTplexes) with transfection-mediating capabilities *in vitro* and *in vivo* (Fig. 1).

In contrast to other macrocyclic MNPs such as CDs or CAs, canonic CTs exhibit identical faces that are brought together after a very efficient macrocyclization step involving a double “click”-type thiourea-forming reaction.<sup>9</sup> The concave shape of the constitutive  $\alpha,\alpha'$ -trehalose moieties, dictated by the concurrence of two *exo*-anomeric effects at the glycosidic linkages, preorganizes the disaccharide to favour macrocyclic over

<sup>a</sup> Department of Organic Chemistry, University of Sevilla, E-41012 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Navarra, E-31008 Pamplona, Spain

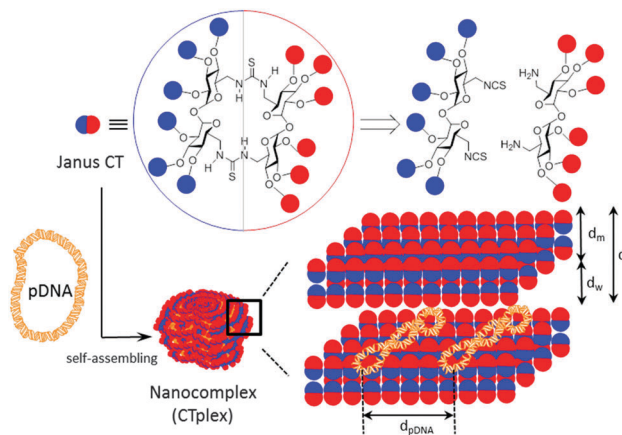
<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, Physical Chemistry and Chemical Engineering, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Spain

<sup>d</sup> Department of Physical Chemistry I, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, Spain

<sup>e</sup> Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), CSIC – Universidad de Sevilla, E-41092 Sevilla, Spain. E-mail: jogarcia@iiq.csic.es

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details (synthesis, electrochemical determinations, nanoparticle characterisation, computational studies, *in vitro* and *in vivo* transfection) and copies of the NMR spectra of the new compounds. See DOI: 10.1039/c6cc04791b



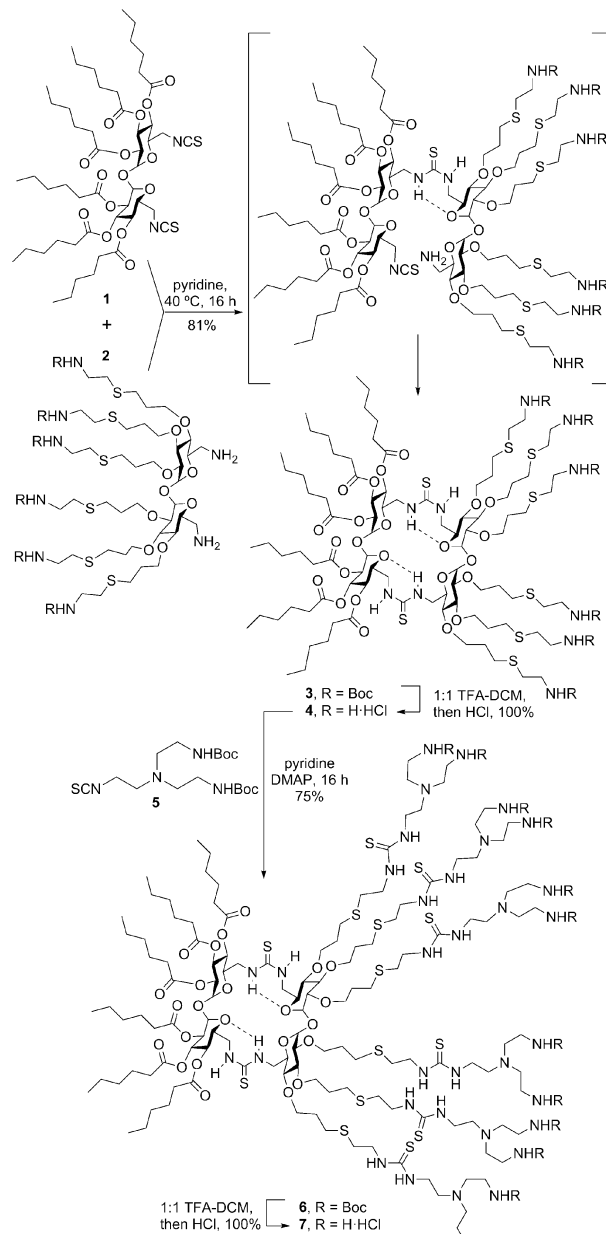


**Fig. 1** Schematic representation of Janus cyclooligosaccharides obtained using thiourea-“clicking” of  $\alpha,\alpha'$ -trehalose halves. In the cartoon, red circles represent cationic groups and blue circles lipophilic substituents. Hierarchical assembly in the presence of plasmid DNA to give nano-complexes (CTplexes) with a lamellar structure is represented.

oligomeric structures upon bridging through the primary positions. Thiourea tethering further reinforces macrocyclization efficiency: after the first isothiocyanate-amine coupling, the formation of a seven-membered intramolecular hydrogen bond stabilizes the *Z,E*-rotamer and places the next reacting groups in close proximity to zip the macroring. We envisioned that stacking of amphiphilic molecular Janus CTs composed of hydrophobic and cationic moieties would be prohibited by the repulsive interactions introduced by the charges on the surface. In the presence of an oligonucleotide chain, the interplay of attractive coulombic and hydrophobic interactions may promote DNA-directed assembly into nanocomplexes whose stability would depend on the protonation extent, which may be used for pH-sensitive non-viral gene delivery.

To check the above working hypothesis, the diisothiocyanate and diamine precursors **1** and **2**, bearing respectively six hexanoyl tails and six protected cationizable amine groups at the secondary hydroxyls, were synthesized (ESI<sup>†</sup>) and reacted ( $\rightarrow$ **3**) to give, after deprotection, the multihead-multitail Janus CT **4** in over 80% yield. Further elaboration of this prototype was performed by thiourea coupling of **4** with the branching building block **5** ( $\rightarrow$ **6**), affording the dendritic adduct **7** (Scheme 1). Both compounds were purposely designed to incorporate structural elements (hexanoyl tails, thiourea H-bond donor centres, multi-valent/dendritic amine clusters) previously found advantageous in the design of molecular artificial viruses.<sup>10</sup>

The effective charges available for coulombic interaction between the Janus CTs and DNA, determined from  $\zeta$ -potential measurements, were found to be significantly different from those expected considering the ionizable N and P atoms in each partner. For instance, CT **4** exhibited positive net charges that are around 75% of the nominal ones in the presence of DNA (Table S1, ESI<sup>†</sup>). Contrary to linear double helix DNA, which keeps its negative charge (−2 per base pair) totally available for the gene vector,<sup>11</sup> plasmid DNA rendered an available negative charge per bp of around 7% of its nominal value when being

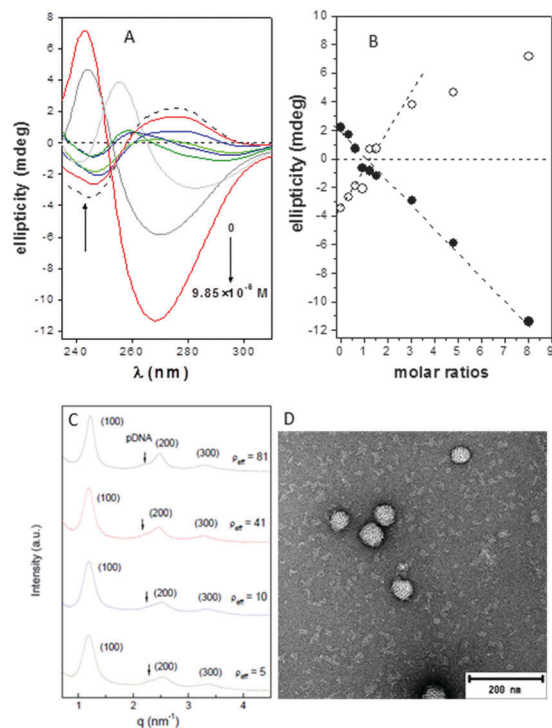


**Scheme 1** Synthesis of the Janus cyclotrehalans **4** and **7**.

compacted by CT **4**. It means that the effective charge ratios,  $\rho_{\text{eff}}$ , are around 10- to 11-fold the nominal charge ratios  $\rho_{\text{nom}}$  (also named as N/P). These data support the fact that the plasmid remains in a supercoiled conformation under physiological conditions, retaining an important percentage of its cationic sodium counter ions after interaction with the vector.

The circular dichroism spectra of DNA registered in the absence and in the presence of compounds **4** or **7** at pH 7.4 unequivocally evidenced the existence of interactions that distorted the typical B-type structure of uncomplexed DNA, probably to a Z-DNA form. Thus, a concentration-dependent decrease in the intensities of the positive and negative bands at 278 and 245 nm, arising from stacking interactions between bases and from polynucleotide helicity, respectively, was initially observed



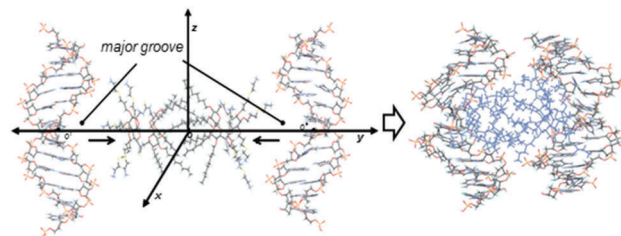


**Fig. 2** (A) Circular dichroism spectra in the 230–325 nm region for solutions containing Janus CT **4** (0, 0.37, 0.75, 1.12, 1.50, 1.87, 3.74, 5.91 and 9.85  $\mu\text{M}$ ) and DNA fixed 1.23  $\mu\text{M}$  concentration in HEPES at 25  $^{\circ}\text{C}$ . (B) Ellipticity values as a function of the **4**:DNA mass molar ratios for the maxima of the two bands appearing near 245 nm (open symbols) and 275 nm (filled symbols). (C) SAXS diffractograms for **4**:pDNA complexes formulated at several effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}}$ ). (D) TEM micrograph of **4**:pDNA complexes formulated at N/P 10.

(Fig. 2A and Fig. S14, ESI<sup>†</sup>), with a change in sign at CT:DNA mass molar ratios higher than 2 (Fig. 2B).

Small-angle X-ray scattering (SAXS) diffractograms (intensity vs.  $q$  factor) of **4**:pDNA complexes at several effective charge ratios ( $\rho_{\text{eff}} = 5, 10, 41$  and  $81$ , i.e. N/P ratios 0.45, 0.91, 3.7 and 7.4, respectively) showed three peaks that were well indexed to a lamellar lyotropic liquid crystal phase,  $L_{\alpha}$ , regardless of  $\rho_{\text{eff}}$  (Fig. 2C). This lamellar arrangement, known to be correlated with potentially high transfection efficiencies,<sup>12</sup> arises from the self-assembly of the Janus CT molecules into lipidic bilayers in the confined space between quasi-parallel DNA supercoils, with thicknesses represented by  $d_{\text{m}}$  and  $d_{\text{w}}$ , respectively, being  $d = d_{\text{m}} + d_{\text{w}}$ . The characteristic interlayer distances,  $d$ , directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi n/q_{\text{hkl}}$ ,  $n$  is the diffraction order) remains constant with  $\rho_{\text{eff}}$  at  $5.2 \pm 0.1$  nm (Fig. 2C and Fig. S13, ESI<sup>†</sup>). Considering these  $d$  values and the fact that pDNA supercoils need around  $d_{\text{w}} \sim 2.5$  nm to be sandwiched by CT bilayers, it can be deduced that the thickness of the bilayer,  $d_{\text{m}}$ , must be around 2.7 nm. TEM micrographs (Fig. 2D) of the CTplexes also showed the aggregates with a clear multilamellar pattern, in full agreement with SAXS results.

To get a deeper insight into the interactions that govern the hierarchical process that leads to CTplex formation, the stability of a head-to-head dimer of **4**, the smallest unit of the bilayer



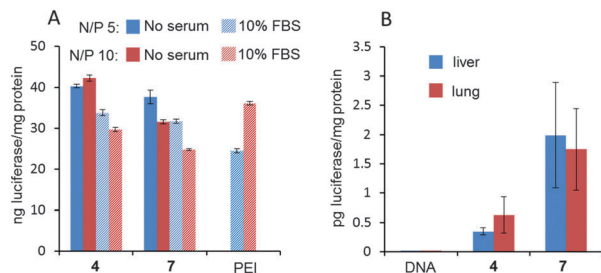
**Fig. 3** Coordinate system used for DNA fragments approaching the MBE structure of the CT **4** dimer along the  $y$  coordinate by the major groove (left) and the MBE structure of the resulting CT:DNA complex (right).

arrangement, was first studied by molecular mechanics (MM) in explicit water. The minimum binding energy (MBE) structure was initially obtained by sequentially approaching two Janus CT molecules in the corresponding perhydrochloride form, with their center of mass on the  $y$  axis in a coordinate system (Fig. S16, ESI<sup>†</sup>). The binding energy profile corresponded to a structure in which the lipidic hexanoyl chains significantly intercrossed and the cationic arms onto the opposite face of the Janus macrocycle adopted an open bouquet disposition to avoid electrostatic repulsions and steric clashes (Fig. S17, ESI<sup>†</sup>). The MBE structure was then placed between two symmetrically located and oriented B DNA helix fragments containing twelve nucleotides (CGCGAATTCGCG) and the oligonucleotide chains were approached simultaneously in steps of 1  $\text{\AA}$  (Fig. 3) through the major groove. The binding energies obtained using this procedure, which were rather favorable, led to an efficient packing. Remarkably, the distance between the centers of mass of the nitrogen clusters in the CTs, which would represent a measurement of the CT bilayer thickness, was reduced from near  $\sim 3.3$  nm for the isolated CT dimer to  $\sim 2.6$  nm for the most stable structure of the CTplex, very well fitting the above SAXS experimental data. The most stable CTplex structure generated (Fig. 3) was used as the starting conformation for 1.0 ns MD simulations, which confirmed the stability of the nanocomplex through the trajectory (Fig. S20 and S21, ESI<sup>†</sup>). Interestingly, when calculations were conducted on a fully cationized form of **4** (by removing the chloride anions) the dimer became unstable. We speculated that increasing protonation in the acidic environment of the endosomes after CTplex cellular uptake would then destabilize the Janus CT bilayers, contributing both to endosome disruption and intracellular DNA release, thereby facilitating the transfection process.<sup>13</sup>

Electrophoretic mobility experiments in the agarose gel followed by visualization using the fluorescent intercalating agent GelRed<sup>®</sup> confirmed that full pDNA complexation was achieved with both Janus CTs **4** and **7** at N/P ratios  $> 1$  ( $\rho_{\text{eff}} > 10$ ). After treatment with a nuclease and dissociation with sodium dodecylsulfate (SDS), intact DNA could be recovered from CTplexes, demonstrating that the DNA cargo was protected from the environment following self-assembly (Fig. S22, ESI<sup>†</sup>). CTplexes formulated with **4** and **7** at N/P ratios 5 and 10, (hydrodynamic diameter 123 to 230 nm;  $\zeta$ -potential +18 to +30 mV. See the ESI<sup>†</sup>, Table S3), promoted transfection in African green-monkey epithelial kidney COS-7 cells (Fig. 4A) and human hepatocellular







**Fig. 4** (A) Transfection efficiency in COS-7 cells for CTplexes formulated with Janus CTs **4** or **7** and the luciferase-encoding reporter gene pCpG-hCMV-SPEC-eLuc at N/P ratios 5 and 10 in the absence and presence of 10% fetal bovine serum (FBS). Data obtained with bPEI polyplexes (N/P = 5 and 10, 10% FBS) under identical conditions are included for comparison. The data represent the mean  $\pm$  SD of three wells and are representative of three independent determinations. (B) Gene expression conducted *in vivo* after intravenous administration of 60  $\mu$ g of pCpG-hCMV-SPEC-eLuc formulated as CTplexes with **4** and **7** at a N/P 10. Bars represent the mean  $\pm$  SD ( $n$  = 7 animals).

carcinoma HepG2 cells (Fig. S22, ESI<sup>†</sup>) with efficiencies that were comparable to those obtained with polyplexes formulated with branched poly(ethyleneimine) (bPEI), a commonly used positive control for nonviral gene delivery, even in the presence of serum. It is noteworthy that no toxicity was observed for any CTplex formulation, compared with 60–70% cell viability for bPEI polyplexes. The nanocomplexes formulated with **4** and **7** at N/P 10 were next injected systemically into mice, and their activity was compared with control PBS and the naked DNA. The results, based on the luciferase reporter gene expression, indicated that 24 h after the intravenous administration of the CTplexes transfection occurs mainly in the liver and lung (Fig. 4B), with negligible luminescence detected in other organs. Increases at transfection levels relative to the naked DNA were above one and two orders of magnitude for 4:pDNA and 7:pDNA CTplexes, respectively. The advantages of the convergent synthetic methodology in terms of versatility and ease of manipulation of the precursors should now allow the preparation of a larger collection of monodisperse Janus MNPs for structure/self-assembly/biological activity relationship studies in view of developing optimized nano-devices programmed for biomedical applications.

The authors thank MINECO (contract numbers CTQ2012-30821, SAF2013-44021-R, CTQ2015-64425-C2-1-R and CTQ2015-64425-C2-2-R), the Junta de Andalucía (contract number FQM2012-1467), University Complutense of Madrid (project no. UCMA05-33-010), the Government of Navarra (Department of Innovation and Industry, contract number IIQ14334.RI1), the University of Navarra Foundation (FUN), and the European

Regional Development Funds (FEDER and FSE) for financial support. SAXS experiments were performed at NCD11 beamline at ALBA Synchrotron Light Facility with the collaboration of ALBA staff. The CITIUS (Univ. Sevilla) is also thanked for technical support.

## Notes and references

- (a) P. G. de Gennes, *Science*, 1992, **256**, 495; (b) A. Walther and A. H. E. Müller, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 5194; (c) Y. Song and S. Chen, *Chem. – Asian J.*, 2014, **9**, 418.
- Y. Liu, B. Liu and Z. Nie, *Nano Today*, 2015, **10**, 278.
- (a) V. Percec, D. A. Wilson, P. Leowanawat, C. J. Wilson, A. D. Hughes, M. S. Kaucher, D. A. Hammer, D. H. Levine, A. J. Kim, F. S. Bates, K. P. Davis, T. P. Lodge, M. L. Klein, R. H. DeVane, E. Aqad, B. M. Rosen, A. O. Argintaru, M. J. Sienkowska, K. Rissanen, S. Nummelin and J. Ropponen, *Science*, 2010, **328**, 1009; (b) S. Zhang, H.-J. Sun, A. D. Hughes, B. Draghici, J. Lejnieks, P. Leowanawat, A. Bertin, L. O. De Leon, O. V. Kulikov, Y. Chen, D. J. Pochan, P. A. Heiney and V. Percec, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1554; (c) H.-J. Sun, S. Zhang and V. Percec, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3900.
- (a) M. Zhang and A. H. E. Müller, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2005, **43**, 3461; (b) L. Cheng, G. Hou, J. Miao, D. Chen, M. Jiang and L. Zhu, *Macromolecules*, 2008, **41**, 8159; (c) B. Nandan and A. Horechyy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 12539; (d) J. Liu and J. Huskens, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 2694.
- W.-B. Zhang, X. Yu, C.-L. Wang, H.-J. Sun, I.-F. Hsieh, Y. Li, X.-H. Dong, K. Yue, R. Van Horn and S. Z. D. Cheng, *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 1221.
- (a) Y. Li, W.-B. Zhang, I.-F. Hsieh, G. Zhang, Y. Cao, X. Li, C. Wesdemiotis, B. Lotz, H. Xiong and S. Z. D. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 10712; (b) H. Liu, C.-H. Hsu, Z. Lin, W. Shan, J. Wang, J. Jiang, M. Huang, B. Lotz, X. Yu, W.-B. Zhang, K. Yue and S. Z. D. Cheng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 10691; (c) L. Gallego-Yerga, M. Lomazzi, F. Sansone, C. Ortiz Mellet, A. Casnati and J. M. García Fernández, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7440.
- (a) V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati and R. Ungaro, *Nat. Commun.*, 2013, **4**, 1721; (b) Y. Li, Y. Qian, T. Liu, G. Zhang, J. Hu and S. Liu, *Polym. Chem.*, 2014, **5**, 1743; (c) L. Gallego-Yerga, M. Lomazzi, V. Franceschi, F. Sansone, C. Ortiz Mellet, G. Donofrio, A. Casnati and J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1708.
- A. Blázquez-Moraleja, M. E. Pérez-Ojeda, J. R. Suárez, M. L. Jimeno and J. L. Chiara, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 5792.
- (a) J. M. Benito, J. L. Jiménez Blanco, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 3674; (b) D. Rodríguez-Lucena, J. M. Benito, E. Álvarez, C. Jaime, J. Pérez-Miron, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 2967; (c) D. Rodríguez-Lucena, C. Ortiz Mellet, C. Jaime, K. K. Burusco, J. M. García Fernández and J. M. Benito, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 2997.
- C. Ortiz Mellet, J. M. Benito and J. M. García Fernández, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 6728.
- E. Junquera and E. Aicart, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, **14**, 649.
- M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 18014.
- L. Gallego-Yerga, L. Blanco-Fernández, K. Urbiola, T. Carmona, G. Marcelo, J. M. Benito, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 12093.



# Journal of Materials Chemistry B

Accepted Manuscript



This article can be cited before page numbers have been issued, to do this please use: A. L. BARRÁN-BERDÓN, M. Martínez-Negro, L. Garcia Rio, O. Domenech, C. Tros de Ilarduya, E. ALCART and E. Junquera, *J. Mater. Chem. B*, 2017, DOI: 10.1039/C6TB02939F.



This is an Accepted Manuscript, which has been through the Royal Society of Chemistry peer review process and has been accepted for publication.

Accepted Manuscripts are published online shortly after acceptance, before technical editing, formatting and proof reading. Using this free service, authors can make their results available to the community, in citable form, before we publish the edited article. We will replace this Accepted Manuscript with the edited and formatted Advance Article as soon as it is available.

You can find more information about Accepted Manuscripts in the [author guidelines](#).

Please note that technical editing may introduce minor changes to the text and/or graphics, which may alter content. The journal's standard [Terms & Conditions](#) and the ethical guidelines, outlined in our [author and reviewer resource centre](#), still apply. In no event shall the Royal Society of Chemistry be held responsible for any errors or omissions in this Accepted Manuscript or any consequences arising from the use of any information it contains.

## PAPER

# Biophysical study of gene nanocarriers formed by anionic/zwitterionic mixed lipids and pillar[5]arene polycationic macrocycles<sup>†</sup>

Cite this: DOI:

Received

DOI:

www.rsc.org/

Ana L. Barrán-Berdón,<sup>#a</sup> María Martínez-Negro,<sup>#a</sup> Luis García-Río,<sup>b</sup> Òscar Domènech,<sup>c</sup> Conchita Tros de Ilarduya,<sup>d</sup> Emilio Aicart<sup>a</sup> and Elena Junquera<sup>\*a</sup>

The use of divalent cations as mediators between anionic lipids (ALs) and nucleic acids has been explored for several years in gene therapy. However, a promising anionic lipid system which could surpass the outcomes of current cationic lipids (CLs) has not been found yet. One plausible reason for such poor efficiencies may be the impossibility of AL-DNA lipoplexes mediated by divalent cations to reach charge inversion, in contrast with the usual behavior of CL-DNA lipoplexes. In the present study, divalent bridge-cations has been replaced by a multivalent positively charged macrocycle in order to see whether charge reversal is reached and how this fact may improve transfection efficiency (TE). For that purpose, an extensive biophysical and biochemical study has been carried out on lipoplexes constituted by a mixture of: i) an anionic lipid DOPG (sodium salt of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)); ii) a zwitterionic lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine), that acts as neutral helper lipid at physiological pH 7.4; iii) a plasmid DNA (pDNA); and iv) a polycationic macrocycle, pillar[5]arene (P<sup>10+</sup>), with the role of bridging the electrostatic interaction between the anionic mixed lipids and the pDNA, also negatively charged. The studies have been done at several DOPG molar compositions ( $\alpha$ ) and pillar[5]arene concentrations. Electrochemical experiments (zeta potential and gel electrophoresis) have revealed that, interestingly, DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplexes show a charge inversion. Both studies have indicated that, at [P<sup>10+</sup>]  $\geq$  15  $\mu$ M, pDNA is efficiently compacted by DOPG/DOPE mixed lipids, using P<sup>10+</sup> as bridge between the negative charge of the AL and anionic pDNA. SAXS diffractograms have shown the presence of two lyotropic liquid crystal phases: an inverted hexagonal one ( $H_{II}^c$ ) found at low composition ( $\alpha = 0.2$ ), and a lamellar one ( $L_{\alpha}$ ) at medium composition ( $\alpha = 0.5$ ). Cryo-TEM and AFM experiments have confirmed these structures. Transfection and cell viability experiments using COS-7 cells in the presence of serum have reported moderate-to-high transfection levels and good cell viability results. The whole ensemble of biophysical and biochemical results of DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplex indicate that this system may open a novel and very promising via in the anionic non-viral gene vectors field.

## 1. Introduction

The use of lipid mixtures as non-viral nanocarriers of nucleic acids is one of the most promising approaches in the field of gene therapy (GT). Its capacity to self-organize into structures (micelles, liposomes, vesicles, liquid crystal phases) that adequately resemble the cell membrane, and its relatively easy preparation have converted these systems into one of the most widely used methods for transfection processes. The most common type of lipids used up to date are the cationic lipids (CLs); however, they present some disadvantages,<sup>1-4</sup> such as their moderate-to-high toxicity and their association with serum proteins that promote phagocytosis.<sup>5-7</sup> Another approach based on lipids is the use of anionic lipids, ALs,

similar to those present in the eukaryotic cell membranes (phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine). Interestingly, they have been found to be more biocompatible and to have lower levels of toxicity.<sup>8-10</sup> In addition, potential phagocytosis of AL based vectors is lower than that one found in cationic gene vectors.<sup>11</sup> However, the negative charge of ALs hinders their direct interaction with the negatively charged DNA molecules. This electrostatic repulsion may be overcome by the use of bridge-cations that allows for the formation of AL-cation-DNA lipoplexes. Several divalent cations have been used for this purpose, such as Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Zn<sup>2+</sup>.<sup>7,12</sup> However, the typical charge reversal phenomenon observed when using CLs has not been found in the case of ALs based systems, and despite of the extensive efforts

performed in the field, their transfection efficiency has been systematically proved to be lower than those of CLs.

We hypothesize that there is a link between the inability of small divalent cations to promote charge reversal, and the low transfection efficiency scores usually obtained using ALs. Therefore, we propose in this work the use of a multivalent cationic entity, with higher amount of positive charges by molecule than common divalent cations, as a new approach to bridge the AL-DNA interaction. The pillar[5]arenes are a new class of multivalent macrocyclic molecules composed of hydroquinone units linked by methylene bridges in their 2,5-positions.<sup>13,14</sup> Pillar[5]arenes have received increased attention in several applications such as chemosensors, transmembrane channels, supramolecular polymers, systems for host-guest chemistry, multichromophoric assemblies with peculiar photophysical properties, liquid-crystalline materials, such as cell glues to agglutinate *Escherichia coli*, and others.<sup>15-24</sup> In the field of GT, a recent study showed that a water-soluble pillar[5]arene with 20 and 40 peripheral ammonium groups was able to interact with the plasmid DNA (pCMV-Luc) and to transfect DNA in HeLa cells lines.<sup>25</sup>

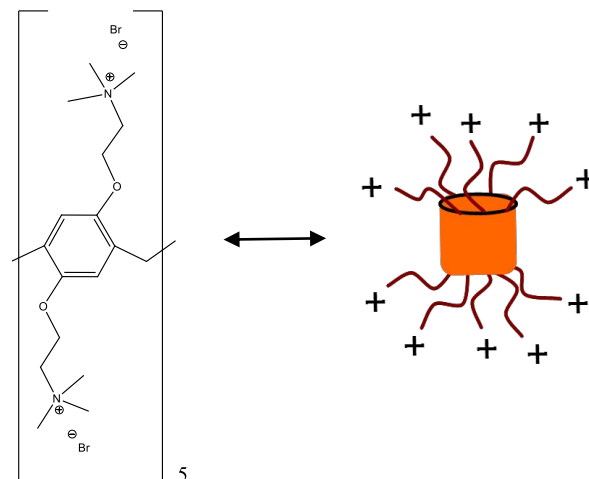
The pillar[5]arene used in this study (Scheme 1) is a water-soluble macrocycle, which has five positive charges at each end of the molecule (10 positive charges in total). This large amount of charges is responsible of the tendency of this molecule to easily dissolve instead of forming supramolecular aggregates in aqueous medium. This characteristic converts pillar[5]arene into a good candidate to substitute divalent cations on AL-cation-DNA complexes. In the present study, we have done for the first time in the literature an extensive biophysical and biochemical characterization of lipoplexes consisting of a mixture of an anionic lipid, DOPG (sodium salt of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)), a zwitterionic lipid, DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine), with null charge at physiological pH 7.4, and a pDNA encoding green fluorescent protein (pEGFP-C3), all mediated by the polycationic macrocycle, pillar[5]arene ( $P^{10+}$ ) above mentioned. The study has been carried out using several biophysical experimental methods, such as, electrophoretic mobility/zeta potential, gel electrophoresis, small angle X-Ray scattering (SAXS), cryogenic electronic transmission microscopy (cryo-TEM), and atomic force microscopy (AFM), together with several biochemical experiments, such as gene transfection (FACS), cell viability/cytotoxicity, and protection against DNases assays. This multidisciplinary approach opens a new framework in the field of biological applications of pillar[n]arene compounds, as novel intermolecular bridges to form charge reversing AL systems with very promising applications as gene vectors.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

The anionic lipid DOPG (sodium salt of 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)) and zwitterionic lipid DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine), with the best purity, were purchased from Avanti Polar Lipids. The cationic water soluble pillar[5]arene (Scheme 1) was synthesized according to a literature procedure,<sup>16</sup> that is resumed in the Electronic Supplementary Information (ESI). pEGFP-C3 plasmid DNA (4700 bp), used on biophysical experiments, was extracted from competent *E. Coli* bacteria previously transformed with pEGFP-C3. The extraction was carried out using GenElute HP Select plasmid Gigaprep Kit

(Sigma Aldrich). All the reagents and solvents, of highest grade commercially available, were used without further purification.



**Scheme 1** Molecular structure of pillar[5]arene.

### 2.2. Preparation of lipoplexes

Appropriate amounts of anionic lipid (DOPG) were dissolved in chloroform to obtain the desired DOPG molar composition ( $\alpha$ ) of the (DOPG + DOPE) lipid mixtures. The amount of DOPG is kept constant in all the samples, the  $\alpha$  molar fraction being regulated by adding the adequate amount of DOPE. After briefly vortexing this solution, chloroform was removed to yield a dry lipid film. The resulting dry lipid films were then hydrated with HEPES 10 mM, pH 7.4, and homogenized by means of a combination of vortexing, sonication and moderate heat. The resulting multilamellar liposomes were transformed into the desired unilamellar liposomes by a sequential extrusion procedure widely explained elsewhere.<sup>26,27</sup> Appropriate amounts of a stock solution of pDNA, prepared one day before, were firstly mixed with adequate volumes of pillar[5]arene solution, and subsequently added to lipid suspensions in order to obtain the lipoplexes with the desired final  $P^{10+}$  concentration. pDNA concentrations were chosen to fit the optimum conditions for each experimental technique.

### 2.3. Characterization of lipoplexes

Phase Analysis Light Scattering technique (Zeta PALS, Brookhaven Instrum. Corp., USA) was used to measure electrophoretic mobility at 25 °C (and from it, zeta potential)<sup>27,28</sup> for lipoplexes as a function of  $P^{10+}$  concentration, at several mixed lipid composition ( $\alpha$ ).

Particle size was measured by Dynamic Light Scattering (DLS), using a particle analyzer (Zeta Nano Series; Malvern Instruments, Barcelona, Spain). Samples were prepared with Buffer HEPES 40 mM pH 7.4 at a final concentration of 1  $\mu$ g pDNA/mL. Experimental conditions were as follows: 25 °C, dispersant refractive index 1.33 (water), viscosity (0.9 cP), and dispersant dielectric constant 78.5.

Lipoplexes along with uncomplexed pDNA were loaded onto 1% agarose gel and run for 30 min at 80 mV in 1x TAE buffer. Fully complexed pDNA appeared as fluorescent band in wells of the gel, while uncomplexed pDNA appeared outside the well. Fluorescence intensity of each band was measured by using commercial Quantity One software provided with Gel Doc XR instrument (Bio-Rad).

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out on the beamline NCD11 at ALBA Synchrotron Barcelona (Spain). The energy of the incident beam was 12.6 KeV ( $\lambda = 0.995$  Å). Samples were placed in sealed glass capillaries. The scattered X-



ray was detected on CCD detector Quantum 210r, converted to one-dimensional scattering by radial averaging, and represented as a function of the momentum transfer vector. SAXS experiments were done for lipoplexes at two mixed lipid compositions,  $\alpha = 0.2$  and  $0.5$ , and several  $P^{10+}$  concentrations.

Cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) experiments were run for DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes following the standard procedure.<sup>29–31</sup> In these experiments, perforated Quantifoil R1.2/1.3 (hole diameter  $1.2\ \mu\text{m}$ ) on a 400-mesh copper grid were used. Images were obtained using a Jeol JEM 2011 cryo-electron microscope operated at 200 kV, under low-dose conditions, and using different degrees of defocus ( $500\text{--}700\ \text{nm}$ ) to obtain an adequate phase contrast.<sup>31</sup> Images were recorded on a Gatan 794 Multiscan digital camera. Finally, the CCD images were processed and analyzed with a Digital Micrograph.

Supported planar bilayers (SPB) for atomic force microscopy (AFM) experiments were prepared as follows:  $50\ \mu\text{L}$  of large unilamellar vesicles (mean diameter value of  $120\ \text{nm}$ ) at  $500\ \mu\text{M}$  in  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  NaCl, and pH 7.4 were incubated onto freshly cleaved mica discs for 2 h over the transition temperature of the lipid mixture. After this period, the non-adsorbed mixed lipid was eliminated by gently rinsing the sample with the same buffer solution. AFM experiments were performed in a Multimode AFM controlled by a Nanoscope V electronics (Bruker AXS Corporation, Madison, WI) under liquid environment at a controlled temperature of  $24.0 \pm 0.2\ ^\circ\text{C}$ . Images were acquired in tapping mode (TM-AFM) with MSNL-10 sharpened silicon nitride tips (Bruker AXS Probes, Camarillo, CA) with a mean spring constant of  $30\ \text{pN}\cdot\text{nm}^{-1}$ . Images were recorded at minimum vertical force maximizing the amplitude set point value and maintaining the vibration amplitude as low as possible. All images were processed using the Bruker software.

DNA protection assays were done by adding DNase I ( $1\ \text{U}/\mu\text{g}$  pDNA) to each sample and stirring for 30 min at  $37\ ^\circ\text{C}$ .  $20\ \mu\text{L}$  of EDTA  $0.25\ \text{M}$  were added to inactive DNase and the samples were incubated for 15 min.  $15\ \mu\text{L}$  of SDS 25% were added and incubated for 5 min followed by  $7\ \mu\text{L}$  of hexadecyltrimethyl-ammonium chloride 25%. Samples were electrophoresed for 40 min under  $80\ \text{mV}$  in 1% agarose gel. The integrity of the plasmid in each composition was compared with untreated DNA as a control.

Cell culture experiments were carried on in COS-7 (African green monkey kidney) cells (American Type Collection, Rockville, MD, USA) were maintained at  $37\ ^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  in complete medium constituted by Dulbecco's modified Eagle's medium- high glucose + glutamax (Gibco BRL Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin ( $100\ \text{U}/\text{mL}$ ) and streptomycin ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

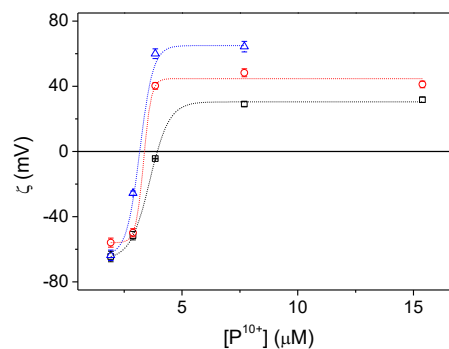
The *in vitro* transfection efficiency (TE) was determined by fluorescence assisted cell sorting (FACS) that permits to analyse the pDNA encoded GFP. Cells were first seeded in medium in 48-well-plates at a confluence of 70% and incubated 24 h at  $37\ ^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  before the transfection initiation. The complexes were added to cells for a period of 4 h in presence of DMEM with 10% FBS. The EGFP expression was analysed 48h post transfection using a FACS Calibur 345 cytometer. For that purpose sample were prepared as follow: the medium was removed and  $200\ \mu\text{L}$  of trypsin 1X was added in each well. After two minutes incubation at  $37\ ^\circ\text{C}$ ,  $400\ \mu\text{L}$  of complete medium were added to neutralize the trypsin. Samples were put into cytometer tubes and centrifuged for 5 min at  $1450\ \text{rpm}$  at  $4\ ^\circ\text{C}$ . Finally the pellet was solved in  $500\ \mu\text{L}$  of a buffer contained PBS with 0.5% BSA and EDTA  $2.5\ \text{mM}$ .

Cell viability was quantified by a modified Alamar blue assay. Briefly,  $1\ \text{mL}$  of 10% (v/v) Alamar blue dye in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% (v/v) FBS medium, was added in each well 48 h after transfection. After 2 h of incubation at

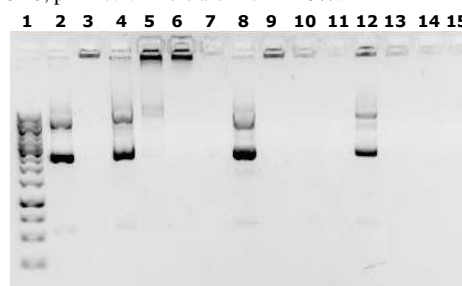
$37\ ^\circ\text{C}$ ,  $200\ \mu\text{L}$  of supernatant was assayed by measuring the absorbance of at  $570\ \text{nm}$  and  $600\ \text{nm}$ . Wells containing medium and Alamar Blue dye without cells were used as blanks. Cell viability was calculated according to the formula  $(A_{570}-A_{600})$  of treated cells  $\times 100 / (A_{570}-A_{600})$  of control cells.

### 3. Results and discussion

An extensive biophysical characterization of the complexes constituted by any kind of gene nanocarrier and a nucleic acid must be based on complementary physicochemical and biochemical studies capable of: i) explaining the type of interactions that count for the complex formation and its structure and morphology; and ii) relating this physicochemical information with the efficiency of the nanocarrier to transfect living cells in a safe manner. With these objectives in mind, we have deeply analyzed in this work DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes by carrying out firstly electrochemical and structural studies, followed by a series of biochemical assays. The zeta potential study permits to check if the negative charge of DOPG/DOPE lipidic mixtures is reduced and/or changed to positive upon interaction with pDNA in the presence of macrocyclic polycationic pillar[5]arene ( $P^{10+}$ ). Fig. 1 shows zeta potential data for DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at several AL compositions ( $\alpha$ ) as a function of  $[P^{10+}]$ . The sigmoidal profile obtained for this system is similar to that one found for lipoplexes formed by CLs, showing a clear charge inversion at a certain  $[P^{10+}]$ , in contrast with the zeta potential profile obtained for ALs and divalent cation  $\text{Ca}^{2+}$ , where an inversion of sign was not observed.<sup>32</sup> This fact, probably due to the polycationic character of the macrocycle  $P^{10+}$ , is really interesting and convenient, because positively charged lipoplexes may enhance the lipoplex-cell membrane interactions. The excess positive charge of  $P^{10+}$  added to the anionic liposome counteracts the negative charge of both, anionic liposome and pDNA. Since the amounts of anionic pDNA and DOPG are the same in the three samples, the  $[P^{10+}]$  that is needed to overcome the electroneutrality must remain constant within the experimental error (ESI, Table S1). Agarose gel electrophoresis experiments were done to determine the optimum conditions for an appropriate pDNA compaction level.



**Fig. 1** Plot of zeta potential ( $\zeta$ ) as a function of  $P^{10+}$  concentration for DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at several AL compositions:  $\alpha = 0.2$  (black squares);  $\alpha = 0.5$  (red circles) and;  $\alpha = 1.0$  (blue triangles). AL/pDNA mole ratio = 1. All the measurements are in HEPES buffer ( $10\ \text{mM}$ ) at  $25\ ^\circ\text{C}$ , pH = 7.4. Errors are within  $\pm 5\%$ .



**Fig. 2** Gel electrophoresis results. Lane 1: Marker. Lane 2: pDNA. Lane 3: (C<sub>16</sub>Im)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>/DOPE-pDNA lipoplex control at  $\alpha = 0.2$  and  $\rho_{\text{eff}} = 2$  (ref. 26). Lanes 4-15: DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplexes at different DOPG/DOPE molar compositions ( $\alpha$ ) and several [P<sup>10+</sup>]:  $\alpha = 0.2$ , lanes 4-7;  $\alpha = 0.5$ , lanes 8-11; and  $\alpha = 1.0$ , lanes 12-15. [P<sup>10+</sup>] = 8  $\mu\text{M}$  (lanes 4, 8 y 12); [P<sup>10+</sup>] = 15  $\mu\text{M}$  (lanes 5, 9 y 13); [P<sup>10+</sup>] = 30  $\mu\text{M}$  (lanes 6, 10 y 14) y [P<sup>10+</sup>] = 60  $\mu\text{M}$  (lanes 7, 11 y 15).

Fig. 2 shows these results at different molar compositions ( $\alpha$ ) and several [P<sup>10+</sup>]. A standard marker and free (uncomplexed) pDNA are respectively loaded in lanes 1 and 2, for control and comparison purposes. A complete loss of pDNA bands along a lane is a clear indication of a full compaction of pDNA (that remains in the well) by P<sup>10+</sup>-bridged DOPG/DOPE lipid nanoaggregates. Fig. 2 shows that the amount of free pDNA decreases with increasing [P<sup>10+</sup>], at each  $\alpha$  value. The results reveal that pDNA is compacted at [P<sup>10+</sup>] > 15  $\mu\text{M}$  – 30  $\mu\text{M}$ , depending on the  $\alpha$  value. Interestingly, a [AL]/[pDNA] ratio = 1 is enough to compact pDNA in comparison with the lipoplexes formed by AL and Ca<sup>2+</sup>, where higher [AL]/[pDNA] ratios were necessary to achieve compaction conditions.<sup>32</sup> The ensemble of electrochemical information (Figs. 1 and 2, and Table S1 of the ESI) indicates that: i) P<sup>10+</sup> polycationic macrocycle may efficiently act as a bridge favouring the interaction among two negatively charged entities, i.e. the anionic surface of DOPG/DOPE mixed lipid nanoaggregates and pDNA plasmid, thus favouring pDNA compaction and hindering pDNA electrophoretic mobility; and ii) pDNA compaction occurs at [P<sup>10+</sup>] higher than those needed to reach the electroneutrality in the system. In other words, the positive and negative charges of the lipoplex components are adequately compensated at electroneutrality, but certain pDNA molecules are not completely compacted yet. For this reason, the combined use of the both techniques is important to understand not only the electrochemical interaction profile taking place within the lipoplex, but also to establish the optimal conditions for the subsequent biophysical and biological studies.

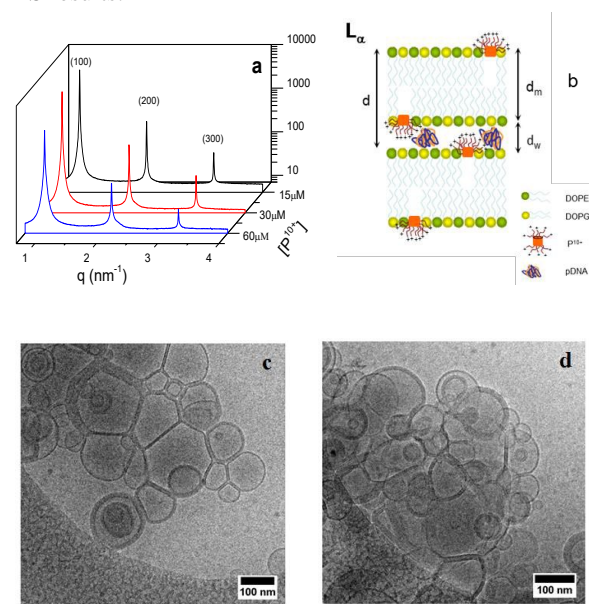
With the aim of gaining insight on the size and structural and morphological aspects of DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplexes, that are known to be correlated with their potential outputs as efficient and safe gene nanocarriers, DLS, SAXS, cryo-TEM and AFM experiments were done at two mixed lipid compositions,  $\alpha = 0.2$  and 0.5. Particle sizes, obtained from DLS experiments, are reported in Table 1. These data reveal the presence of particles in the nanometric range, with a relatively low polydispersity index (PDI) values in all the cases, irrespectively of the  $\alpha$  values and the [P<sup>10+</sup>]/[pDNA] ratios, this evidence being quite interesting in what respect to their potential biochemical outcomes.

**Table 1** Particle size and polydispersity index (PDI) for DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplexes at two AL compositions ( $\alpha$ ) and different [P<sup>10+</sup>]/[pDNA] ratios. Data are reported as the mean  $\pm$  s.d. of three independent measurements

[P <sup>10+</sup> ]/[pDNA]	$\alpha = 0.2$		$\alpha = 0.5$	
	Size (nm)	PDI	Size (nm)	PDI
2	121 $\pm$ 10	0.22	204 $\pm$ 20	0.27
4	214 $\pm$ 20	0.18	262 $\pm$ 10	0.28
8	187 $\pm$ 10	0.30	180 $\pm$ 20	0.30

Fig. 3 shows the combined results obtained from SAXS and cryo-TEM, at  $\alpha = 0.5$ . SAXS diffractograms (intensity vs.  $q$  factor) are reported at different [P<sup>10+</sup>] on panel (a), while two examples of cryo-TEM micrographs, obtained at [P<sup>10+</sup>] = 30  $\mu\text{M}$ , are shown in panels (c) and (d). The Miller indexes, shown over the Bragg peaks in the diffractograms, index well to a

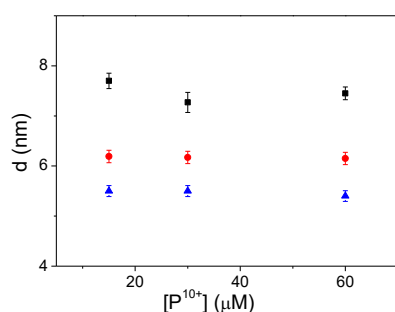
lamellar lyotropic liquid crystal structure ( $L_\alpha$ ) which may be drawn as alternating bilayers of mixed lipids and an aqueous monolayer containing supercoiled pDNA (see the scheme in panel b). The inter-layer distance ( $d$ ) directly related to the  $q$  factor ( $d = 2\pi/q_{100}$ ), can be expressed as the sum of the thicknesses of the lipidic bilayer ( $d_m$ ) and of the aqueous monolayer ( $d_w$ ) as shown in panel b ( $d = d_m + d_w$ ). The broad and smoothed Bragg peak pointed with arrows in the diffractograms arise from the pDNA-pDNA correlation, and its  $q_{\text{pDNA}}$  factor permit to determine the separation between pDNA supercoils ( $d_{\text{pDNA}}$ ) in the monolayer ( $d_{\text{pDNA}} = 2\pi/q_{\text{pDNA}}$ ). Fig. 4 shows a plot of  $d$  and  $d_{\text{pDNA}}$  vs. [P<sup>10+</sup>]. None of them show an appreciable influence of polycationic macrocycle concentration, i.e.,  $d = (6.2 \pm 0.1)$  nm, while  $d_{\text{pDNA}} = (5.5 \pm 0.1)$  nm on average. This  $L_\alpha$  multilamellar arrangement is confirmed by cryo-TEM micrographs (Fig. 3, panels c and d) where some cluster-type (CT) nanoaggregates can be seen, as those commonly found in lipoplexes formed by cationic lipids.<sup>26,27,32</sup> The average inter-lamellar spacing ( $d$ ) can be also determined by using an image processing protocol<sup>33</sup> based on plots of grey levels (related to the level of electronic density) vs. distance across the lipidic bilayer. The presence of several peaks in these plots confirms the multilamellar arrangement of bilayers and allows determining the inter-lamellar spacing from the distance between the maxima. In the present case, working with an important number of processed images, an average value of  $d = (6.4 \pm 0.3)$  nm has been obtained, in good agreement with SAXS results.



**Fig. 3** Structural study of DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup>-pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.5$ . Panel a: SAXS diffractograms at [P<sup>10+</sup>] = 15, 30 y 60  $\mu\text{M}$ . The arrow indicates the pDNA-pDNA correlation peak. Panel b: schematic drawing of a 2D view of multilamellar  $L_\alpha$  phase. Notice that P<sup>10+</sup> is slightly intercalated into the bilayer with some or all of the positive charges exposed to the aqueous monolayer. Panels c and d: a selection of cryo-TEM micrographs at [P<sup>10+</sup>] = 30  $\mu\text{M}$ .

Cryo-TEM experiments were also done for DOPG/DOPE-P<sup>10+</sup> nanoaggregates in the absence of pDNA (ESI, Fig. S6,  $\alpha = 0.5$ , [P<sup>10+</sup>] = 30  $\mu\text{M}$ ). A multilamellar arrangement with a typical finger-print (FP) pattern is clearly observed in the micrographs. The inset on panel (a) shows a FFT (Fast-Fourier-Transform) profile that confirms the  $L_\alpha$  structure that may be

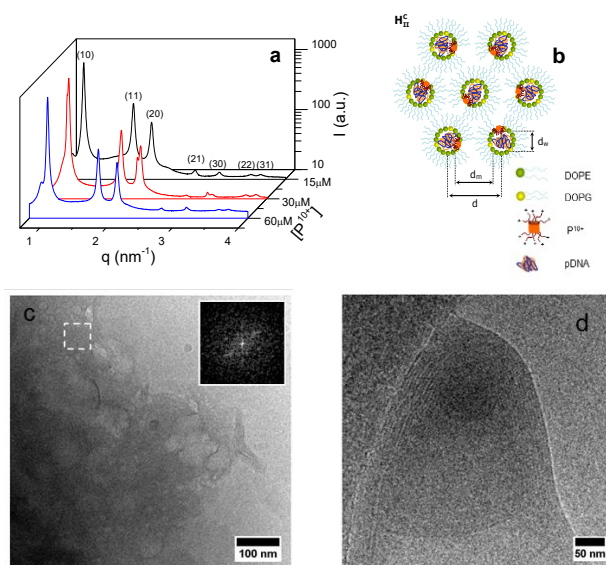
understood in terms of stacked anionic lipid bilayers of DOPG/DOPE interacting electrostatically by the mediating action of  $P^{10+}$  multivalent cationic macrocycle, (ESI, Fig. S6, panel d). Additionally, an average inter-lamellar spacing of  $d = (5.2 \pm 0.2)$  nm has been determined by using the periodicity analysis above commented (see panel b). Considering that this value is even slightly lower than that one found for DOPG/DOPE- $Ca^{2+}$  ( $\approx 5.5$  nm) system,<sup>32</sup> and that the size of  $P^{10+}$  polycation is clearly higher than that of the divalent cation  $Ca^{2+}$ , we can conclude that the  $P^{10+}$  polycationic macrocycle may allocate the aromatic cycles immersed within the lipid bilayer with the 10 charged tails directed towards the anionic polar head-surface region, as is drawn in the scheme of panel (d). Although a multilamellar ordering has been found in the DOPG/DOPE- $P^{10+}$  systems, in both, absence and presence of pDNA, the morphology is quite different as can be clearly noticed in Fig. 3 and S6 of ESI. The lipidic bilayers are arranged in a FP pattern in the absence of pDNA, whereas the presence of pDNA induces the formation of CT nanoaggregates. Both patterns are already reported in other studied lipoplexes,<sup>26,34-37</sup> but not in lipid nanoaggregates in the absence of pDNA. The fact that DOPG/DOPE- $P^{10+}$  mixtures show this type of ordering is indicative of the bridge action of  $P^{10+}$  polycation among negatively charged DOPG/DOPE bilayers. The increase in the interlamellar distance ( $d$ ) of the systems with pDNA (6.4 nm) with respect to the value obtained in the absence of pDNA (5.2 nm) is consistent with the proposed scheme where pDNA supercoils are sandwiched among the  $P^{10+}$  bridged-DOPG/DOPE bilayers as shown in Fig. 3.



**Fig. 4** Plot of the inter-lamellar distance ( $d$ ) of the hexagonal  $H_{II}^c$  phase (black squares) and lamellar  $L_{\alpha}$  phase (red circles) for the DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes vs  $[P^{10+}]$ . The  $d_{pDNA}$  distance for  $L_{\alpha}$  phase (blue triangles) is also included in the plot. Notice that  $d = d_{pDNA}$  for  $H_{II}^c$  phase.

When the content of AL in the lipid mixture is low (excess of DOPE with respect to DOPG) the structural scenario changes. Fig. 5 shows SAXS diffractograms and cryo-TEM micrographs of DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.2$ . It is remarkable that SAXS peaks on panel (a) index well with a  $H_{II}^c$  lyotropic liquid crystal phase, constituted by inverted cylindrical micelles in hexagonal ordering with the plasmid supercoils immersed within the aqueous interior of the cylinders (panel b). Cryo-TEM micrographs (panels c and d) confirm this  $H_{II}^c$  hexagonal ordering, as can be seen in FFT profile shown in the upper-right inset of panel (c), where the diffraction spot corresponds to a typical hexagonal pattern. Interestingly,  $H_{II}^c$  structures were also found for DOPG/DOPE-

$Ca^{2+}$ -pDNA lipoplexes at high DOPE content, thus confirming that the structure is mostly dependent on the packing parameters of the lipids present in the mixture, and not on the type of bridge-cation used, neither on its concentration. In fact, the packing parameter of DOPE, clearly above 1, is typical of lipids that aggregate in form of inverse phases.<sup>38</sup> Consequently, the mixture DOPG/DOPE tends to self-organize in form of either direct lamellar phases (low-to-medium DOPE content) or reverse hexagonal ones (high DOPE content), as seen both in SAXS and cryo-TEM experiments, with a curvature that would depend on the content of DOPE in the mixture. The distance ( $d$ ) can be determined from the SAXS diffractograms, since it is directly related with  $q$  values ( $d = a = d_{pDNA} = 4\pi/\sqrt{3}q_{10}$  in  $H_{II}^c$  phase). Fig. 4 also includes a plot of  $d$  in this hexagonal phase as a function of  $[P^{10+}]$ . As can be seen in the figure,  $d$  remains basically constant with polycation concentration, with a value of  $(7.5 \pm 0.2)$  nm on average, similar to that one obtained for the hexagonal structure found in DOPG/DOPE- $Ca^{2+}$ -pDNA (7.6 nm) and other lipoplexes formed by CLs.<sup>32,39,40</sup> If the thickness of lipid bilayer is assumed to be around  $d_m = 4.5$  nm, as normally reported for membranes constituted by dioleoyl- $C_{18}$  lipids,<sup>26</sup>  $d_w$  can be straightforward determined:  $d_w = (1.7 \pm 0.1)$  nm for  $L_{\alpha}$ , and  $d_w = (3.0 \pm 0.2)$  nm for  $H_{II}^c$  structures.



**Fig. 5** Structural study of DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at  $\alpha = 0.2$ . Panel a: SAXS diffractograms at  $[P^{10+}] = 15, 30$  y  $60 \mu$ M. Panel b: schematic drawing of 2D view of the  $H_{II}^c$  hexagonal phase where  $d = a = d_{pDNA}$ . Notice that  $P^{10+}$  is slightly intercalated into the bilayer with some or all of the positive charges exposed to the aqueous monolayer. Panels c and d: a selection of cryo-TEM micrographs at  $[P^{10+}] = 30 \mu$ M. The inset on panel c shows Fast Fourier Transform (FFT) profile calculated over a selected area (see dashed white square) on the original micrograph; notice that the diffraction spot corresponds to a typical hexagonal pattern.

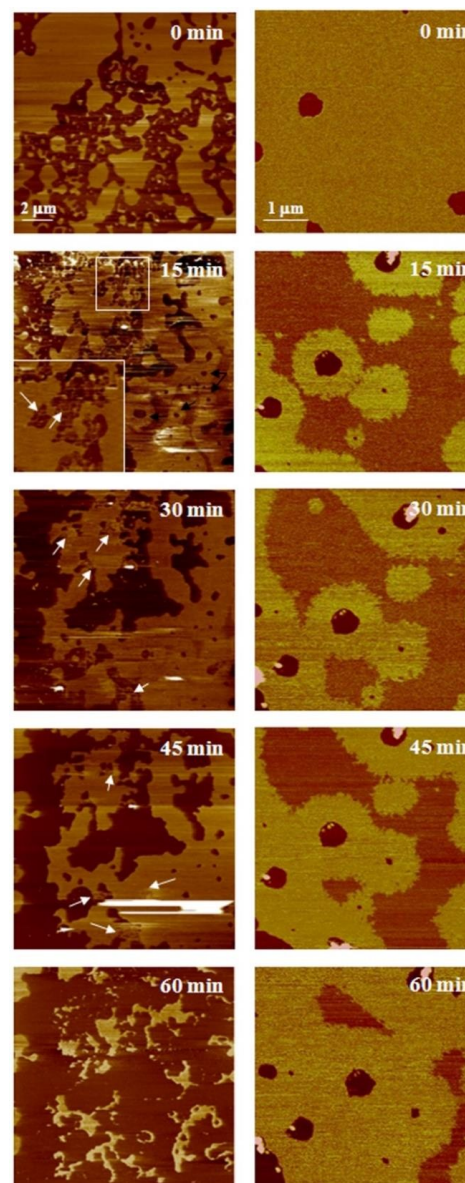
The interaction between lipidic membranes and pDNA, in this present case mediated by  $P^{10+}$  polycation, is known to be another key factor on the transfection process. AFM has revealed to be one of the techniques of choice to visualize this interaction. AFM results, reported in Fig. 6, show the time lapse sequence of the interaction of  $P^{10+}$ -pDNA with DOPG/DOPE



supported planar bilayers (SPBs) at two different DOPG/DOPE molar compositions ( $\alpha$ ). At  $\alpha = 0.2$  (left images), before the interaction (0 min), SPB partially covers the mica surface as wide extensions in the half-top of the image while forming smaller flat structures on the other half of the image. The SPB presents a step height from the mica surface to the top of the lipid bilayer of  $(6.0 \pm 0.4)$  nm with a mean roughness value of 0.37 nm. After incorporation of the  $P^{10+}$ -pDNA aggregates (15 min) they can be observed on the SPB surface as white spots. It is remarkable the different behaviour of the interaction with the SPB depending on the region observed. While a deposition of new material surrounding the holes (black arrows) is observed at the bottom-right of the image, the presence of tiny lines (white arrows) with similar height than the SPB connecting the different SPBs regions are seen at the top-center of the image (zoom in the image). At 30 min, new tiny lines appear (white arrows) while more material is deposited and covering the SPB near the holes at the bottom-right of the image. After 45 min, the new material deposited has formed a completed layer onto the SPB while the formation of new tiny lines on the uncovered mica progresses. Remarkably, the aggregate at the bottom-right of the SPB has been grown due to the deposition of new material due to the destabilization of the SPB. Finally, at 60 min almost of the SPB regions have been solubilized and moved away from the scan area, and only small spots of the SPB remain onto the mica surface. At  $\alpha = 0.5$  (images on the right), before the interaction (0 min) the SPB covers a great extension of the mica surface with a step height of  $(6.1 \pm 0.3)$  nm and with a mean roughness value of 0.34 nm. These values are quite similar to the ones for the SPB with  $\alpha = 0.2$ . After incorporation of the  $P^{10+}$ -pDNA (15 min), some material begins to grow around the holes with a step height from the lipid bilayer to the top of this new structure of  $(2.8 \pm 0.4)$  nm. The lower domain presents a mean roughness value of 0.63 nm, while the upper domain is rougher with a mean value of 0.85 nm. There are also some aggregates (white structures) deposited in the holes, that is onto mica surface. As incubation time progresses (15-60 min), the extension of the new structure on the SPB surface increases. The extension grows from the holes towards the flat regions of the SPB covering the 85% of the SPB surface at 60 min. In this sample no destabilization of the lipid layer is observed.

The interaction of  $P^{10+}$ -pDNA with SPBs of DOPG/DOPE seems to depend on the content of DOPG in the SPB. At  $\alpha = 0.5$  the  $P^{10+}$ -pDNA induces the formation of a new layer on the SPB surface without disruption of the lipid bilayer. This layer could be due to the deposition of layers of  $P^{10+}$ -pDNA onto the SPB surface, but it is more probably due to a primary adsorption of  $P^{10+}$ -pDNA close to the holes, where the surface tension of the lipids is higher and the stability of the lipid layer is decreased. Then, the  $P^{10+}$ -pDNA adsorbed could be used as nucleation points from where the new deposited  $P^{10+}$ -pDNA organizes and grows around. This effect is also observed in the  $\alpha = 0.2$  sample but at this DOPG molar composition there are much more DOPE than at  $\alpha = 0.5$ . Then,  $P^{10+}$ -pDNA adsorbed at the nearby of the holes could promote the formation of non-lamellar structures due to the potentiality of the DOPE to be arranged in a hexagonal phase, in good agreement with SAXS and cryo-TEM results. Once the lipid bilayer is destabilized and enhanced by the lateral scanning of the AFM tip, the molecules forming the lipid bilayer could be promoted to the media as mixed lipid- $P^{10+}$ -pDNA aggregates and swept away from the scanned area. The AFM results showed clearly the strong

interaction of each component of the mixed lipid bilayers ( $P^{10+}$ ) and pDNA.

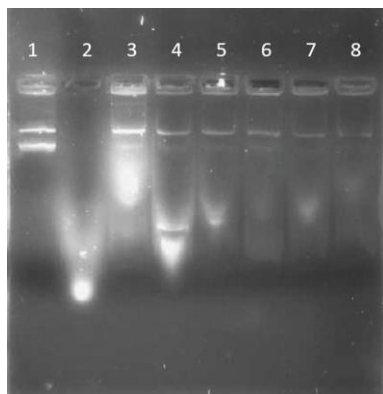


**Fig. 6** A selection of AFM micrographs showing a general view of the DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at two DOPG/DOPE molar compositions:  $\alpha = 0.2$  (left images) and  $0.5$  (right images), at  $[P^{10+}] = 30 \mu\text{M}$  and at different incubations times.

On the other hand, DNA protection assay was assessed to confirm the capacity of the DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes to protect DNA against DNase I degradation. Fig. 7 reports the results obtained in the gel electrophoresis assay done at two molar compositions  $\alpha = 0.2$  and  $0.5$ , and at three  $[P^{10+}]/[\text{pDNA}]$  ratios = 2, 4 and 8. Lane 1 shows coiled and supercoiled forms of the DNA. Naked plasmid DNA digested within the first minutes following DNase I addition were used as control (lane 2). The DNA bands on lanes 3-8 indicate the presence of an intact DNA, confirming that the DOPG/DOPE- $P^{10+}$  compact the plasmid avoiding the access of the DNase I. This efficient protection of pDNA from degradation points to



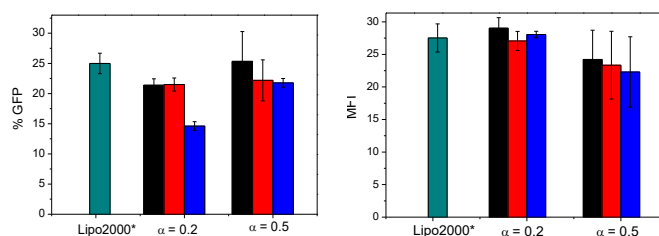
DOPG/DOPE- $P^{10+}$  nanocarrier as a potential non-viral gene vector.



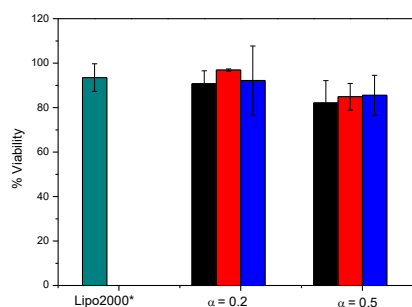
**Fig. 7** Electrophoresis gel of DNA protection for the plasmid pEGFP-C3. Lane 1: pDNA. Lane 2: pDNA-DNases. Lanes 3-8: DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes treated with DNases at different DOPG/DOPE molar compositions ( $\alpha = 0.2$ , lanes 3-5; and  $\alpha = 0.5$ , lanes 6-8) and  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratios (2, lanes 3 and 6; 4, lanes 4 and 7; and 8, lanes 5 and 8).

Once the lipoplexes studied herein were electrochemical and structurally analysed, its capacity to transfect the pDNA to the cells and their cytotoxicity levels were checked. The transfection experiments were carried out in COS-7 cells with 10% in serum, for  $\alpha = 0.2$  and 0.5, each of them at three different  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratios = 2, 4 and 8. Lipofectamine 2000 (Lipo2000\*) was used as a positive control. Fig. 8 shows TE results in terms of % GFP (% population cells expressing GFP protein) and mean fluorescence intensity (MFI, i.e. level of GFP protein expression per cell on average). The whole ensemble of TE data indicates that DOPG/DOPE- $P^{10+}$  nanoaggregates are able to transfect the pEGFP-C3 plasmid with moderate-to-high transfection efficiency at all compositions. In fact, the TE levels (in terms of MFI) found at  $\alpha = 0.2$  and all  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratios, are even better than those reported by the control Lipo2000\*. This is a remarkable evidence since both SAXS and cryo-TEM have been previously detected inverted hexagonal lyotropic liquid crystal phases ( $H_{II}^c$ ) at this particular DOPG/DOPE composition of the mixed lipids, with DOPE as the major component. Interestingly, this hexagonal phase-high TE correlation has been already reported in the literature for other cationic lipoplexes.<sup>41-43</sup> It is known that zwitterionic lipids, such as DOPE, play an important role in transfection processes because they increase the fusogenic properties of the vector and reduce the cytotoxicity of the complex. Furthermore, its Israelachvili packing parameter above 1 justifies its tendency to induce the formation of inverse self-aggregates.<sup>38</sup> All these features may explain the fact that the  $H_{II}^c$  structure is more fusogenic than  $L_{\alpha}$ , and, accordingly, why lipoplexes with the  $H_{II}^c$  structure interact better with the cell membrane and, after endocytosis, release pDNA that escapes from the endosome to the cytosol.<sup>44,45</sup> It is also remarkable that transfection studies reported in the literature using ALs show very low TE values, compared to Lipo2000\*.<sup>10</sup> The addition of  $Ca^{2+}$  to the ALs seemed to improve slightly TE, but it was accompanied in some cases by an increase on the cytotoxicity.<sup>9,32</sup> Thus, the good TE results reported in this work for DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pEGFP-C3 lipoplex point to the polycationic macrocyclic entities as adequate mediators in the

lipid vector-pDNA interaction, much better indeed than the small cations, such as  $Ca^{2+}$ .



**Fig. 8** Transfection efficiency (%GFP cells and MFI) in COS-7 cells of the DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes at two DOPG/DOPE molar compositions ( $\alpha = 0.2$  and 0.5). Experiments were performed with 1  $\mu$ g of pDNA per well in the presence of 10% of serum (FBS). Green colour is Lipo2000\*, while black, red and blue correspond to a  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratio = 2, 4 and 8, respectively.



**Fig. 9** Cell Viability of COS-7 cells in the presence of the DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes with 1  $\mu$ g of pDNA per well, at two DOPG/DOPE molar compositions ( $\alpha = 0.2$  and 0.5). Green colour is Lipo2000\*, while black, red and blue correspond to a  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratio = 2, 4 and 8, respectively.

Finally, Fig. 9 reports the % of cell viability of COS-7 cells in the presence of DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pEGFP-C3 lipoplexes. It must be noted the high viability of this gene vector at the two molar compositions ( $\alpha = 0.2$  and 0.5) and at all  $[P^{10+}]/[pDNA]$  ratios = 2, 4 and 8. In fact, cell viabilities are comparable to those yielded by the control Lipo2000\*, ranging from 80 to 95% in the all of cases. In conclusion, in view of the high viability of DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplex, as well as of the good efficiency obtained in the optimum conditions, a new lipofection *via* with nanocarriers formed by anionic/zwitterionic lipids and polycationic macrocycles may be opened, with this lipoplex being considered as a promising gene vector even for *in vivo* assays.

### 3. Conclusions

A series of experiments consisting of a biophysical Electrochemical studies of DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes have shown the typical charge inversion process already reported by CLs based lipoplexes but not found in other ALs based vectors with small bridge-cations, as  $Ca^{2+}$ . It means that the polycationic macrocycle, pillar[5]arene ( $P^{10+}$ ), has revealed as much more effective than small cations in the role of bridging the electrostatic interaction between the anionic mixed lipids and the pDNA, also negatively charged. AFM experiments have demonstrated that this interaction among each component of the mixed lipid bilayers ( $P^{10+}$ ) and pDNA is quite strong. Structural evaluation has indicated that DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes show mean sizes on the

nanometric range, with a reasonably moderate polydispersity, both features being potentially favourable for their success as efficient gene nanocarriers. Furthermore, both SAXS diffractograms and cryo-TEM micrographs point to the presence of two different lyotropic liquid crystal phases depending on AL composition: inverted cylindrical micelles in hexagonal ordering ( $H_{II}^c$ ) with the plasmid supercoils immersed within the aqueous interior of the cylinders when DOPE is the major component of the mixture of lipids ( $\alpha = 0.2$ ), that turns to a multilamellar ( $L_\alpha$ ) phase characterized by alternating DOPG/DOPE- $P^{10+}$  multilayers and an aqueous monolayer containing supercoiled pDNA when the content of anionic lipid (DOPG) in the mixture increases ( $\alpha = 0.5$ ). The biochemical studies show interesting results for DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes, combining moderate-to-high transfection efficiencies with high cell viability values (80-95%), similar to those of the positive control Lipo2000\*. In particular, the best TE outcomes have been found at a mixed lipid composition at which DOPE is the major component ( $\alpha = 0.2$ ) for which both SAXS and cryo-TEM have revealed the presence of  $H_{II}^c$  phases. Once again, this particular self-aggregation pattern is related with a good efficiency of the lipid vector on transfecting cells. Accordingly, this work opens the door to a new trial with biofriendly anionic lipids as promising gene vectors, where the interaction with the nucleic acid is mediated by polycationic macrocycles.

## Acknowledgements

The authors thank MINECO of Spain (contract numbers CTQ2012-30821, CTQ2015-65972-R, CTQ 2015-64425-C2-2-R and CTQ2014-55208-P), Xunta de Galicia (2007/085), and University Complutense of Madrid (Spain) (project no. UCMA05-33-010). SAXS experiments were performed at NCD11 beamline at ALBA Synchrotron Light Facility with the collaboration of ALBA staff. cryo-TEM experiments were performed at the Servei de Microscopia of Univ. Autònoma de Barcelona (Spain). Authors also thank C. Aicart-Ramos for carrying on amplification of plasmid DNA at the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (University Complutense of Madrid, Spain).

## Notes and references

<sup>b</sup>Grupo de Química Coloidal y Supramolecular, Departamento de Química Física I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Departamento de Química Física, Centro de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>d</sup>Departamento de Fisicoquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, E-31008 Pamplona, Spain

<sup>#</sup>These authors contributed equally

\*Author to whom the correspondence should be addressed  
E. Junquera: Fax: +34913944135 e-mail: [junqueira@quim.ucm.es](mailto:junqueira@quim.ucm.es)

<sup>†</sup>Electronic Supplementary Information (ESI) available: Synthesis procedure and characterization of the pillar[5]arene macrocycle; concentration of  $P^{10+}$  at which DOPG/DOPE- $P^{10+}$ -pDNA lipoplexes reach the electroneutrality, at different molar compositions ( $\alpha$ ); and additional cryo-TEM micrographs showing DOPG/DOPE nanoaggregates in the presence of  $P^{10+}$ , at  $\alpha = 0.5$  and  $[P^{10+}] = 30 \mu M$ .

- 1 S. Bhattacharya and A. Bajaj, *Chem. Commun.*, 2009, 4632-4656.
- 2 J. H. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, 84, 7413-7417.
- 3 A. Masotti, G. Mossa, C. Cametti, G. Ortaggi, A. Bianco, N. Del Grosso, D. Malizia and C. Esposito, *Colloids Surf. B*, 2009, 68, 136-144.
- 4 L. Wasungu and D. Hoekstra, *J. Controlled Release*, 2006, 116, 255-264.
- 5 G. Caracciolo, L. Callipo, S. C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi and A. Lagana, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1798, 536-543.
- 6 G. Caracciolo and H. Amenitsch, *Eur. Biophys. J.*, 2012, 41, 815-829.
- 7 C. Srinivasan and D. J. Burgess, *J. Controlled Release*, 2009, 136, 62-70.
- 8 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS Journal*, 2005, 7, E61-E77.
- 9 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *AAPS J.*, 2004, 6, E29.
- 10 S. D. Patil, D. G. Rhodes and D. J. Burgess, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1711, 1-11.
- 11 F. Roerdink, N. M. Wassef, E. C. Richardson and C. R. Alving, *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 734, 33-39.
- 12 H. Liang, D. Harries and G. C. L. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, 102, 11173.
- 13 T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. A. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5022-5023.
- 14 N. L. Strutt, R. S. Forgan, J. M. Spruell, Y. Y. Botros and J. F. Stoddart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 5668-5671.
- 15 J. Z. Fan, H. M. Deng, J. Li, X. S. Jia and C. J. Li, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 6343-6345.
- 16 Y. J. Ma, X. F. Ji, F. Xiang, X. D. Chi, C. Y. Han, J. M. He, Z. Abliz, W. X. Chen and F. H. Huang, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 12340-12342.
- 17 I. Nierengarten, S. Guerra, M. Holler, L. Karmazin-Brelot, J. Barbera, R. Deschenaux and J. F. Nierengarten, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, DOI: 10.1002/ejoc.201300356, 3675-3684.
- 18 I. Nierengarten, S. Guerra, M. Holler, J. F. Nierengarten and R. Deschenaux, *Chem. Commun.*, 2012, 48, 8072-8074.
- 19 T. Ogoshi, M. Hashizume, T. A. Yamagishi and Y. Nakamoto, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 3708-3710.
- 20 T. Ogoshi, N. Ueshima and T. Yamagishi, *Org. Lett.*, 2013, 15, 3742-3745.
- 21 T. Ogoshi, K. Umeda, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *Chem. Commun.*, 2009, DOI: 10.1039/b907894k, 4874-4876.
- 22 T. Ogoshi, D. Yamafuji, D. Kotera, T. Aoki, S. Fujinami and T. Yamagishi, *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 11146-11152.
- 23 G. C. Yu, C. Y. Han, Z. B. Zhang, J. Z. Chen, X. Z. Yan, B. Zheng, S. Y. Liu and F. H. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 8711-8717.

- 24 G. C. Yu, Y. J. Ma, C. Y. Han, Y. Yao, G. P. Tang, Z. W. Mao, C. Y. Gao and F. H. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 10310-10313.
- 25 I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J. S. Remy and J. F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 17552-17558.
- 26 S. K. Misra, M. Muñoz-Ubeda, S. Datta, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2013, 14, 3951-3963.
- 27 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, S. Datta, C. Aicart-Ramos, P. Castro-Hartmann, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *Biomacromolecules*, 2012, 13, 3926-3937.
- 28 M. Muñoz-Ubeda, S. K. Misra, A. L. Barran-Berdon, C. Aicart-Ramos, M. B. Sierra, J. Biswas, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 18014-18017.
- 29 J. Bednar and C. L. Woodcock, *Chromatin*, Academic Press Inc, San Diego, CA, 1999.
- 30 J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell and P. Schultz, *Q. Rev. Biophys.*, 1988, 21, 129-228.
- 31 J. Dubochet, B. Zuber, M. Eltsov, C. Bouchet-Marquis, A. Al-Amoudi and F. Livolant, in *Methods Cell. Biol.*, 2007, vol. 79, pp. 385-406.
- 32 A. L. Barran-Berdon, B. Yelamos, M. Malfois, E. Aicart and E. Junquera, *Langmuir*, 2014, 30, 11704-11713.
- 33 A. Rodriguez-Pulido, A. Martin-Molina, C. Rodriguez-Beas, O. Llorca, E. Aicart and E. Junquera, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, 15648-15661.
- 34 A. L. Barran-Berdon, S. K. Misra, S. Datta, M. Muñoz-Ubeda, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2, 4640-4652.
- 35 A. L. Barran-Berdon, B. Yelamos, L. Garcia-Rio, O. Domenech, E. Aicart and E. Junquera, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7, 14404-14414.
- 36 K. Kumar, A. L. Barran-Berdon, S. Datta, M. Munoz-Ubeda, C. Aicart-Ramos, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 1495-1506.
- 37 M. Martinez-Negro, K. Kumar, A. L. Barran-Berdon, S. Datta, P. Kondaiah, E. Junquera, S. Bhattacharya and E. Aicart, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8, 22113-22126.
- 38 J. Israelachvili, *Intermolecular and Surfaces Forces: with Applications to Colloidal and Biological Systems*, Academic Press, London, 1992.
- 39 M. Muñoz-Ubeda, A. Rodriguez-Pulido, A. Nogales, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Biomacromolecules*, 2010, 11, 3332-3340.
- 40 M. Muñoz-Ubeda, A. Rodriguez-Pulido, A. Nogales, O. Llorca, M. Quesada-Perez, A. Martin-Molina, E. Aicart and E. Junquera, *Soft Matter*, 2011, 7, 5991-6004.
- 41 K. Ewert, N. L. Slack, A. Ahmad, H. M. Evans, A. J. Lin, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 133-149.
- 42 A. J. Lin, N. L. Slack, A. Ahmad, C. X. George, C. E. Samuel and C. R. Safinya, *Biophys. J.*, 2003, 84, 3307-3316.
- 43 D. Pozzi, G. Caracciolo, R. Caminiti, S. C. De Sanctis, H. Amenitsch, C. Marchini, M. Montani and A. Amici, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2009, 1, 2237-2249.
- 44 E. Junquera and E. Aicart, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2014, 14, 649-663.
- 45 E. Junquera and E. Aicart, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2016, 233, 161-175.